

**YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DENEYSEL DİABETİK RATLARDA
BEYİN İSKEMİ PERFÜZYON HASARINDA NİTRİK
OKSİT MİKTAR TAYİNİ**

Kimyager Demet KEPENEK

**F.B.E. Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Programında
Hazırlanan**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tez Danışmanı : Yar. Doç. Dr. Volkan SÖZER

Prof. Dr. M. Koray GÜMÜŞTAŞ



Yrd. Doç. Dr. Volkan Sözer



Doç. Dr. İnci Arisan



İSTANBUL, 2004

İÇİNDEKİLER

KISALTMA LİSTESİ.....	iii
ŞEKİL LİSTESİ.....	iv
ÇİZELGE LİSTESİ.....	v
ÖNSÖZ.....	vi
ÖZET.....	vii
ABSTRACT.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
2. TEORİK KISIM.....	2
2.1 Nitrik Oksit (NO).....	2
2.1.1 Nitrik Oksit Sentezi	2
2.1.2 Nitrik Oksit'in Moleküler Etkileşimleri.....	4
2.2 Nitrik Oksit Sentaz (NOS)	5
2.2.1 Nitrik Oksit Sentazın Genel Yapısı ve Özellikleri.....	5
2.2.2 Nitrik Oksit Sentaz'ın İzofomları.....	6
2.2.3 Nitrik Oksit Sentaz'ın İnhibitörleri.....	7
2.3 Nitrik Oksit'in Fizyolojik Etkileri.....	8
2.4 Canlılarda Oksijen Radikallerinin Yapımı.....	10
2.4.1 Süperoksit Radikali.....	11
2.4.2 Hidrojen Peroksit.....	12
2.4.3 Hidroksil Radikali.....	13
2.4.4 Bir Radikal Olarak Nitrik oksit	15
2.5 Beyin İskemi Reperfüzyon Hasarı.....	17
2.5.1 Lipid Peroksidasyonu.....	18
2.5.2 Lipid Karboksilasyonu.....	19
2.5.3 Protein Oksidasyonu.....	20
2.5.4 DNA Hasarı.....	20
2.5.5 Nötrofil Kaynaklı Hücre Hasarı	21
2.6 Diabette Glikasyon Ürünlerinin Oluşumu.....	21
2.6.1 Glikozillenmiş Hemoglobin.....	23
2.7 Diabette Serbest Radikal Oluşumu.....	24
2.7.1 Nitrik Oksit ve Diabet İlişkisi.....	24
2.8 Antioksidanların Diabetteki Önemi.....	25
2.8.1 E Vitamini.....	26
2.8.1.1 Antioksidan Olarak E Vitamininin Hastalıkların Önlenmesi ve Tedavisindeki Rolü	27
2.8.1.2 E Vitamini Yetersizliği.....	29

3	DENEYSEL KISIM.....	30
3.1	Kullanılan Cihazlar, Eşyalar ve Kimyasal Maddeler.....	30
3.1.1	Kullanılan Cihazlar ve Eşyalar.....	30
3.1.2	Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	31
3.2	Deney Öncesi Deney Hayvanlarına Yapılan İşlemler.....	32
3.2.1	Sıçanların Diabetik Yapılması.....	32
3.3	Kan Şekeri Tayini.....	33
3.4	Glukozillenmiş Hemoglobin Tayini.....	34
3.5	Nitrit/ Nitrat Tayini.....	35
4	DENEYSEL SONUÇLAR.....	37
5	SONUÇLAR ve TARTIŞMALAR.....	38
	KAYNAKLAR	40
	ÖZGEÇMİŞ.....	47



KISALTMA LİSTESİ

BH ₄	Tetrahidrobiopterin
cGMP	Siklik guanozin monofosfat
CK-BB	Kraetin kinaz BB
c-NOS	Konstitütif nitrik oksit sentaz
DNA	Deoksiribo nükleik asit
FAD	Flavin adenin dinükleotit
FMN	Flavin mononükleotit
GR	Glutatyon redüktaz
GSH	Glutatyon
GSHPx	Glutatyon peroksidaz
HO ₂ [·]	Hidroperoksil
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
HbA _{1c}	Glikozillenmiş hemoglobin
IDDM	İnsüline bağlı diabetes mellitus
i-NOS	İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
LDL	Düşük yoğunluklu lipoprotein
LNA	N-nitro L- arginin
L-NAME	L nitro- L arginin metil ester
L-NMMA	N monometil-L arginin
LPS	Lipopolisakkarit
LTB ₄	Lökotrien B ₄
MAD	Malonil dialdehid
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NO	Nitrik oksit
NOS	Nitrik oksit sentaz
NSE	Nöron spesifik enolaz
O ₂ ^{·-}	Süperoksit Radikali
PAF	Trombosit aktive edici faktör
SOD	Süper oksit dismutaz
STZ	Streptozotosin

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1	Nitrik oksidin biyosentezi.....	2
Şekil 2.2	NO sentaz reaksiyonu.....	3
Şekil 2.3	Bilinen NO sentaz izoenzimleriyle NO sentezi.....	3
Şekil 2.4	Nitrik oksit/ cGMP transdüksiyon yolu.....	4
Şekil 2.5	Nöronal, sitokin ile indüklenen, endotelial nitrik oksit sentaz ve sitokrom P-450 redüktazın amino asit dizileri.....	5
Şekil 2.6	Hidroksil radikallerinin, hücrede lipid peroksidasyonu, protein oksidasyonu ve DNA hasarını başlatması.....	15
Şekil 2.7	Lipid peroksidasyonu.....	18
Şekil 2.8	Proteinlerin glikasyonu.....	22
Şekil 2.9	Hemoglobinin non-enzimatik glikozillenmesi.....	23



ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge 2.1	NO Sentazın izoformları	7
Çizelge 2.2	Enzimatik ve non - enzimatik oksidanlar	17
Çizelge 2.3	Günlük E vitamini gereksinimi	27
Çizelge 2.4	Kontrol grubu, diabetik grup, diabetik + vitamin E gruplarının glukoz (% mg) değerleri.	37
Çizelge 2.5	Kontrol grubu, diabetik grup, diabetik + vitamin E gruplarının HbA _{1c} (%) değerleri.	37
Çizelge 2.6	Kontrol grubu, diabetik grup, diabetik + vitamin E gruplarının total nitrit+nitrat (Nmol/L) değerleri.	37
Çizelge 2.7	Kontrol grubu, diabetik grup, diabetik + vitamin E gruplarının ortalama glukoz (% mg), HbA _{1c} (%), total nitrit+nitrat, (Nmol/L) değerleri.	38
Çizelge 2.8	Ortalama glukoz (% mg) değerlerinin karşılaştırılması.	38
Çizelge 2.9	Ortalama HbA _{1c} (%) değerlerinin karşılaştırılması.	38
Çizelge 2.10	Ortalama total nitrit+nitrat (Nmol/L) değerlerininin karşılaştırılması.	38



ÖNSÖZ

Öncelikle tez çalışmalarına yön veren, benden bilgisini ve yardımını esirgemeyen değerli hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Volkan Sözer'e,

Tezimin hazırlanmasında, her konuda bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi sayın hocam Prof.Dr. M.Koray Gümüştaş'a,

Yüksek lisans öğrenimimde maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen anneme ve babama,

Ayrıca, yardımlarından ve desteğinden dolayı Tanıl Durkaya'ya,

Sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.



ÖZET

Nitrik oksit (NO) L-Argininden NO sentaz (NOS) katalizörlüğünde kompleks kofaktörlerin yer aldığı bir reaksiyon sonucunda sentezlenen yüksek reaktif özellikli serbest bir radikaldır. İnsülin eksikliğine bağlı olarak oluşan diabetes mellitusta serbest oksijen radikallerinin artışının bir çok diabetik komplikasyonları indüklediği bilinmektedir. Süperoksit radikalının radikal özelliğindeki NO ile etkileşmesi sonucunda NO etkinliğinin azalması ile birlikte toksik olan yeni radikaller oluşmaktadır. Çeşitli antioksidan molekülleri ve detoksifikasyon enzimlerinin uygulanması ile meydana gelen hasarlar önlenebilmektedir. Bunun yanı sıra dönüşümsüz NOS inhibitörü olan N-Nitro-L-Arginin (LNA) uygulanması plazma NO azalışına ve beyin dokusu süperoksit artışına sebep olmaktadır. Artan NO konsantrasyonu etkisi ile oluşan S-Nitrosotiyol bileşikleri ve biyolojik özellikleri NO biyolojisinin önemli bir bölümüdür. Glutasyon, hücreleri reaktif nitrojen oksit türlerinden GSNO oluşumu yolu ile korur. Memelilerin hücrelerinde glutasyon miktarının azalması ile NO toksisitesi artar. Ölçülen NO miktarında proteinlerin hangi oranda nitrozilleneceğini ve fonksiyonlarının hangi derecede bozulacağını gösterir.

Anahtar Kelimeler: Nitrik oksit (NO), Nitrik oksit sentaz (NOS), Diabetes mellitus, N-Nitro L-Arginin(LNA), antioksidan moleküller, STZ, Vitamin E.

ABSTRACT

Nitric oxide (NO), is a highly reactive free radical which is synthesized from L-Arginin by the catalytic activity of nitric oxide syntetase (NOS). In diabetes mellitus, increase of the free oxygen radical levels induces various diabetic complications. When the superoxide radicals intract with the nitric oxide radical, nitric oxide activity is decreased and new radicals are introduced. Many of the demages can be controlled by using antioxidants and detokxification enzymes. Application of NOS's irreversible inhibitor (N-Nitro-L-Arginin) causes the plasma NO's level to decrease and brain tissue's superoxide level to increase. The formation and properties of S-Nitrosothiol (RSNO) play an important part of the biology of nitric oxide. Glutathione (GSH) can protect cells against the toxicity of reactive species (RSNO) such as NO through the initial formation of GSNO. In mamlian cells depletion of intracelular GSH increases toxicity mediated by NO. Measured NO quantity can show us at what degree proteins are nitrosilated and their functions are impaired.

Key Words: Nitric oxide (NO), Nitric oxide syntetase (NOS), Diabetes mellitus, N-Nitro L-Arginin(LNA), antioxidants, STZ, Vitamine E

1- GİRİŞ

Nitrik oksit (NO), L-Arginin 'den nitrik oksit sentaz (NOS) katalizörlüğünde kompleks kofaktörlerin yer aldığı bir reaksiyon sonucunda sentezlenen yüksek reaktif özellikli serbest bir radikaldir. Vasküler endotelyum, monositler, makrofajların yanında beyinde de sentez edilir (Kausic ve Cosentino, 1994; Kuo ve Schroender, 1995).

Beyinde De nova sentezi temelde iki tip NOS izoenzimi tarafından yapılmaktadır. Bunlardan c-NOS, konstitutif c-NOS olarak bilinir ve bazal koşullarda düşük miktarlarda (nM) NO oluşturur, serebral parankimal ve perivasküler nöronlarda bulunur (Garthwaite,1991; Zhang vd.,1993). i-NOS indüklenebilir NOS olarak bilinir ve yüksek miktarlarda (μ M-mM) NO oluşumundan sorumludur. Nöronal astrosit ve mikroglia hücrelerinde minimal aktivitede bulunur. Lipopolisakkarit ve sitokinlerin uyarısıyla NO oluşumunu sağlar (Bredt vd., 1990; Kirk vd., 1990).

Bu gözlemlerden anlaşılacağı gibi birçok patolojik durum ve hastalıklarda NO oluşumunun artışı, NO' nun indüklediği nörotoksisite ile ilişkilidir (Kuo and Schroender, 1995).

İnsülin eksikliğine bağlı olarak oluşan diabetes mellitus'da, serbest oksijen radikallerinin artışının birçok diabet komplikasyonunu indüklediği bilinmektedir. Özellikle oluşan süperoksit radikallerinin ($O_2^{\cdot-}$)diğer radikal ve biyomoleküller ile etkileşmesi sonucunda hücresel fonksiyonların bozulduğu da gözlemlenmiştir. Süperoksit radikalının, radikal özelliğindeki NO ile etkileşmesi sonucunda NO etkinliği azaldığı gibi peroksinitrit olarak bilinen vasküler sistem için çok toksik olan bir radikal de oluşmaktadır (Lorenzi ve Caliero, 1991; Schmidt vd., 1994).

Serebral İskemi-reperfüzyon, deney hayvanlarında yapıldığında fokal nörolojik lezyonlar serebral korteksde oluşabilmektedir. Bu durumu NO oluşumu ve oksijen hasarı şiddetlendirmektedir. Çeşitli antioksidan molekülleri ve detoksifikasyon enzimlerinin uygulanmasının bu hasarın büyük ölçüde önlenmesine katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Kirk vd., 1990; Frindovich , 1978).

Bu bilgiler ışığında bu projede amacımız, deneysel akut diabet oluşturulmuş sıçanlarda, ılımlı serebral iskemi reperfüzyon modelinin kontrollere göre ne ölçüde NO oluşumuna sebep olduğunu gözleyip, antioksidan uygulanan deney grubunda NO etkinliğini artırabileceğini incelemektir.

2- TEORİK KISIM

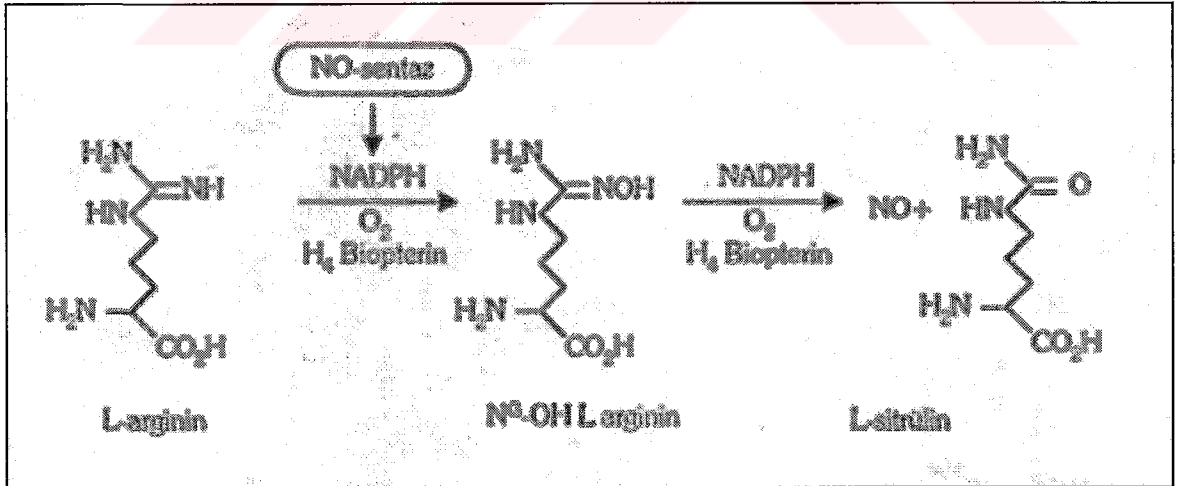
2.1- Nitrik Oksit (NO)

2.1.1- Nitrik Oksit Sentezi

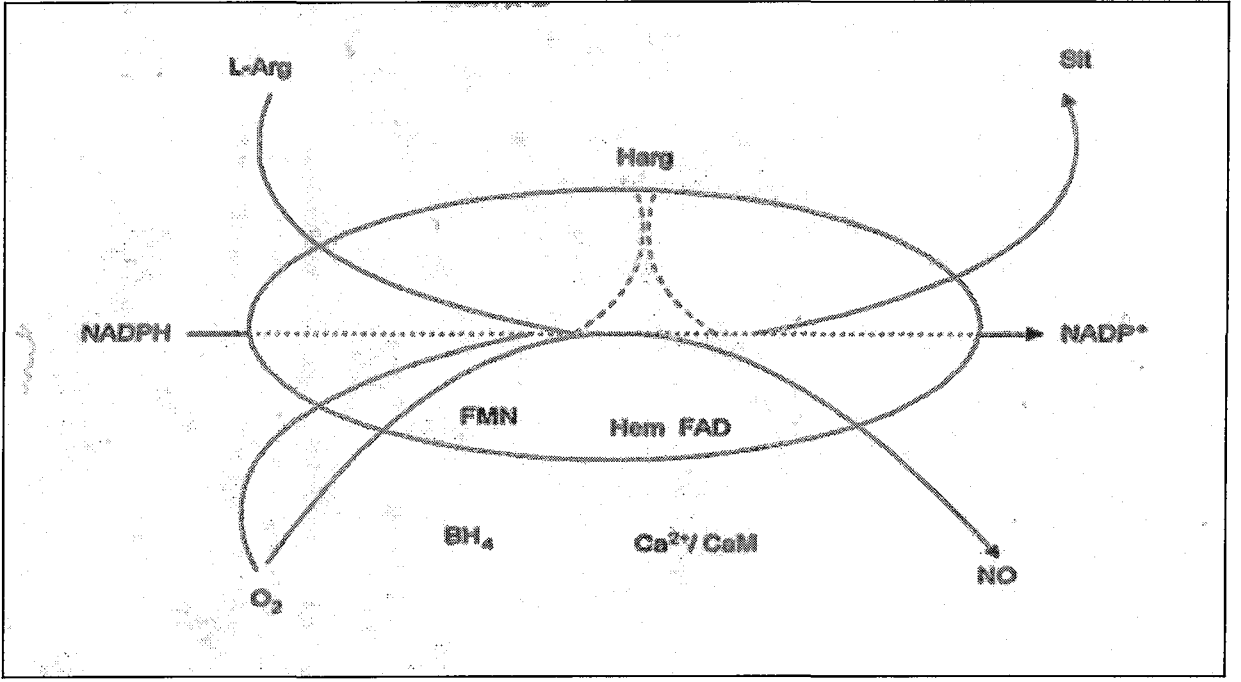
Nitrik oksit suda zayıf olarak çözünen radikal özelliğinde bir gazdır. Dokudaki yarı ömrü kısadır(10-60 sn) (Knowles ve Moncado,1992). Yarı ömrü oksijen varlığında 4 dakikaya kadar uzayabilmektedir (Taha vd., 1992) Reaktivitesi ne kadar hızlı uzaklaştırıldığına ve yıkıldığına bağlıdır.

Asetilkolin'in izole edilmiş tavşan aortasının gevşemesini indüklemesi için endotelial hücreler ortamda bulunmalıdır (Furchgott ve Zawadaki, 1980). Düz kasın asetilkolin yoluyla yaptığı bu endotele bağımlı gevşeme ilk 1980 yılında bildirilmiş ve 1987-1988 de bu endotel kökenli gevşetici faktörün nitrik oksit adlı serbest radikal olduğu gösterilmiştir (Palmer vd., 1987-1988).

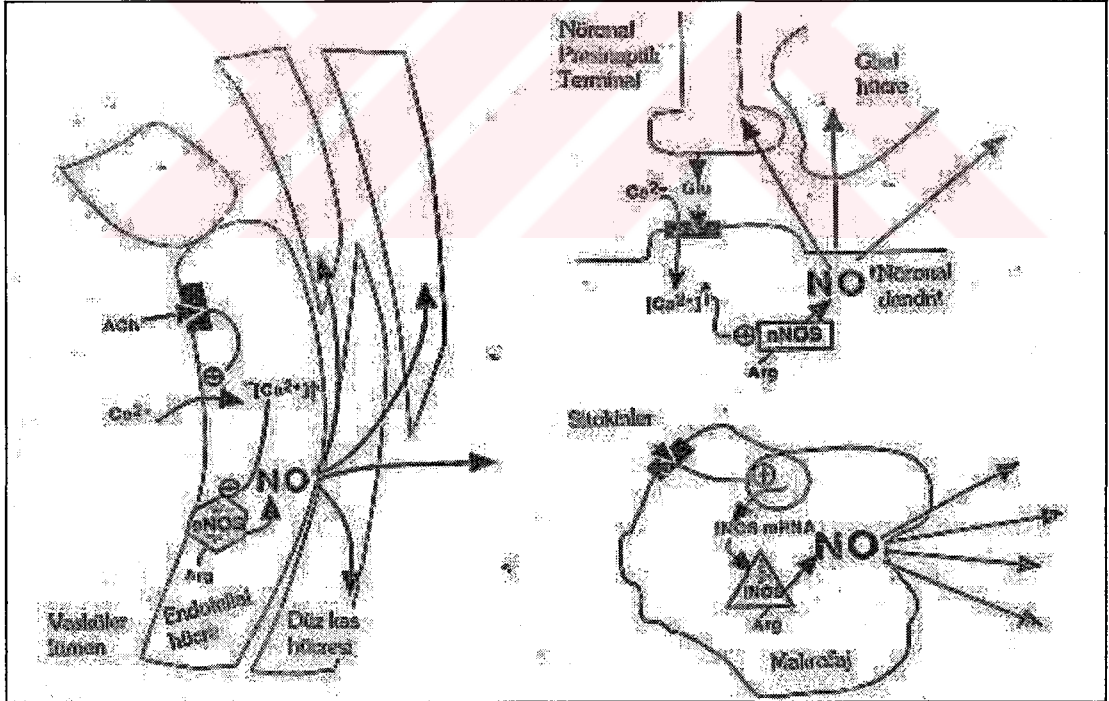
Biyosentez şekli ne olursa olsun NO, her zaman L-argininin L-sitruiline dönüşümü sonucu meydana çıkar. Bu iki adımda gerçekleşen bir reaksiyon olup N^G hidroksi-L arginin (NOHA) anahtar aracı maddedir. Genellikle NO biyosentezinin son ve kararlı oksidatif ürünleri NO₂ ve NO₃'dür.



Şekil2.1 Nitrik oksidin biyosentezi



Şekil 2.2 NO sentaz reaksiyonu

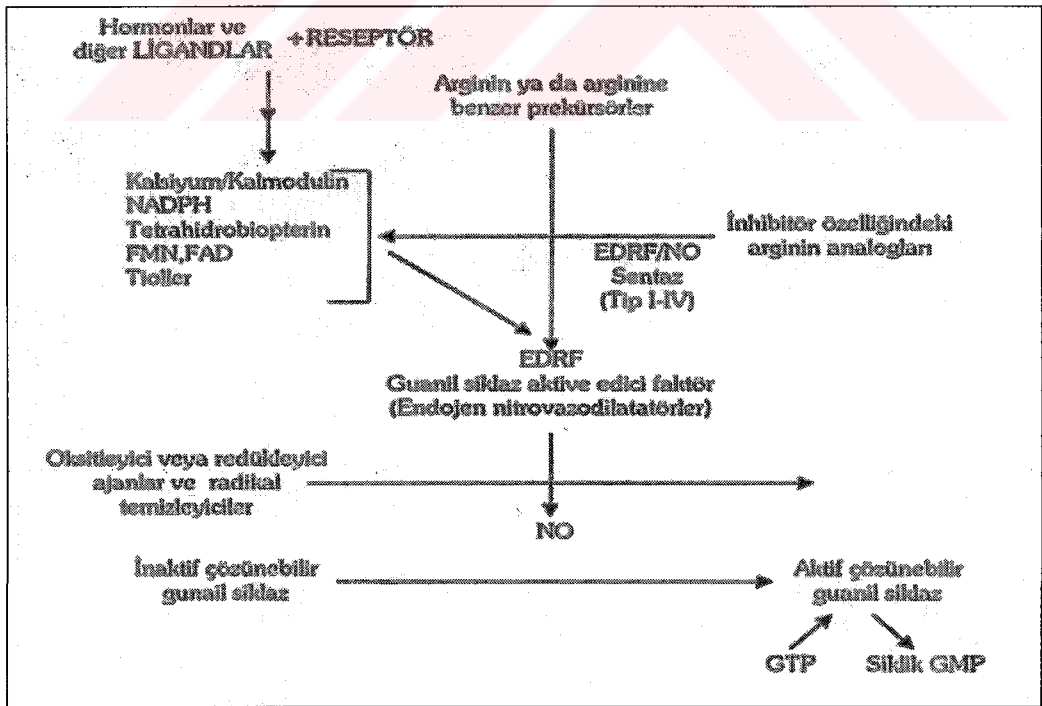


Şekil 2.3 Bilinen NO sentaz izoenzimleriyle NO sentezi

2.1.2- Nitrik Oksidin Moleküler Etkileşimleri

Nitrik oksit çeşitli düşük ve yüksek molekül ağırlığına sahip moleküllerle reaksiyon verir. İntraselüler kalsiyum düzeyinin artması sonucu endotel hücrelerde oluşan NO, guanilat siklazın hem grubuna bağlanır. Bu konformasyonel değişim guanilat siklazın katalitik kısmını aktive eder, c-GMP üretimindeki artış vasorelaksasyonla sonlanır. NO c-GMP yoluyla transselüler zarlarda değişikliklere sebep olur. Nitrozohem, NO tarafından hemoglobin, myoglobin, siklooksijenaz, lipooksijenaz veya sitokrom p-450 ile reaksiyonundan sonra üretilir. Bu reaksiyonun enzim regülasyonundaki rolü ve protein görevi iyi bir biçimde tanımlanmıştır. Makrofajların sitotoksik özelliklerinin, demir içeren enzimlerle hedef hücrelerde reaksiyon veren NO tarafından devam ettirildiği düşünülmektedir. Bu nitrozasyon mitokondriyal solunum inhibisyonuna, akonitaz aktivitesine ve ribonükleotid redüktaz DNA sentezindeki hız tayin edici basamağa etki eder. NO, DNA hasarına ve mutasyonlara da sebep olur.

NO, aynı zamanda S-nitrozotioilleri (RS-NO) ortaya çıkarmak için tiollerle de reaksiyon verir. Bu reaksiyon serum proteinlerindeki reaktif SH grupları ve NO'nun etkileşimidir. Bu türler NO için uzun bir süre saklanabilir form oluşturur.



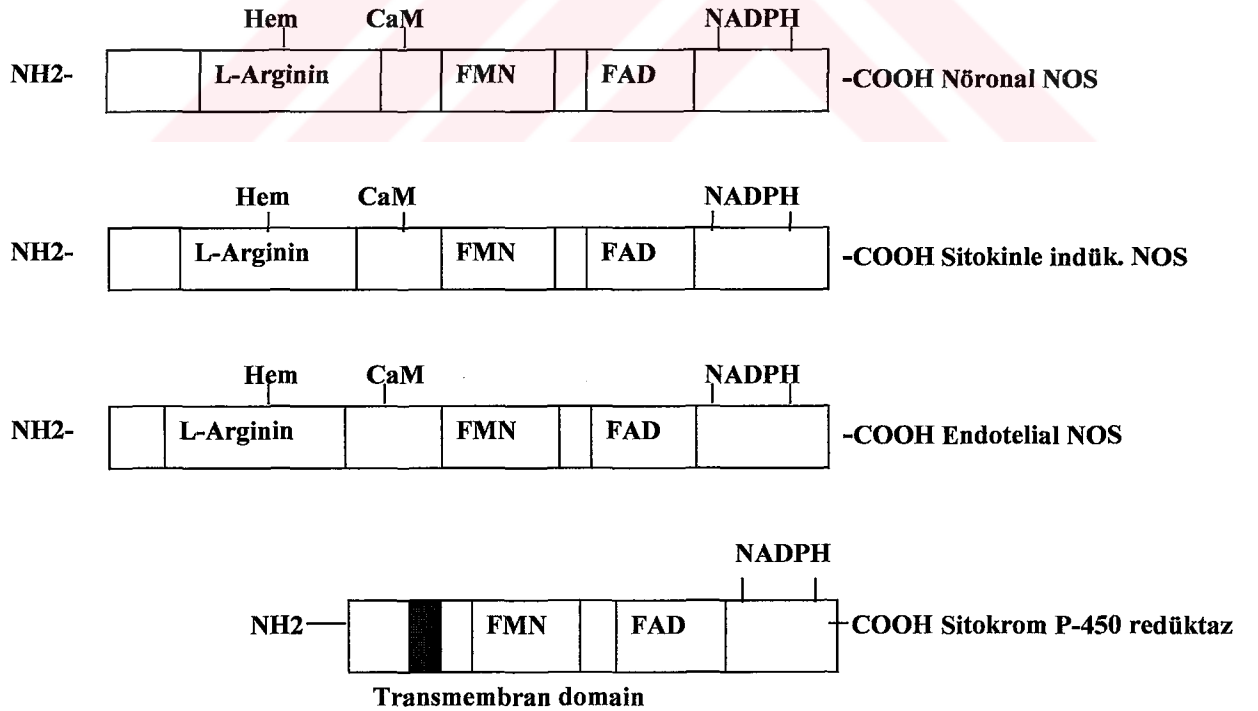
Şekil 2.4. Nitrik oksit/ cGMP transdüksiyon yolu

2.2- Nitrik Oksit Sentaz (NOS)

2.2.1- Nitrik Oksit Sentazın Genel Yapısı ve Özellikleri

NOS izoformları, ekspresyonları ve regülasyonları açısından farklılık gösterse de, katalizlenen reaksiyon bir bütün olarak aynıdır (L arginin elektron oksidasyonu). Burada substrat olarak moleküler oksijen ve NADPH'ın yanı sıra elektronların zincir içerisinde transportu için FAD (flavin adenin dinükleotit) ve FMN (flavin mononükleotit) de gerekmektedir (Marletta vd.,1988; Mayer vd., 1991). Bu kofaktörlere ek olarak tetrahidrobiopterine de ihtiyaç vardır.

NOS' un primer yapısı bu enzimin α -helikal yapıda bir protein olduğunu ortaya koymaktadır. NADPH, FAD ve FMN bağlanma bölgeleri iyi bir biçimde tanımlanmıştır. Dizileri açığa çıkarılmış memeli proteinleri arasında NOS, sadece sitokrom P-450 redüktaz ile yakın bir homoloji göstermektedir (641 aminoasit arasında %58'lik bir homoloji vardır). Son bulgular NOS' un kompleks bir enzim olduğunu işaret etmektedir. Çünkü FAD ve FMN bağlanma bölgelerine ve NADPH, Sitokrom P-450 redüktaz ile göstermiş olduğu şaşırtıcı benzerliğe ek olarak NOS'un aynı zamanda polipeptid zinciri üzerinde hem (White ve Marletta, 1992) bölgesinde içermektedir.



Şekil 2.5 Nöronal, sitokin ile indüklenen, endotelial nitrik oksit sentaz ve sitokrom P-450 redüktazın amino asit dizileri

2.2.2- Nitrik Oksit Sentaz'ın İzofomları

Nitrik oksit sentaz'ın 4 izoformu tanımlanmıştır. Bu izoformlar bölgesel dağılımları, regülasyon tarzları, moleküler ağırlıkları ve farklı genler tarafından kodlandığından birbirinden farklıdır.

Bu izoformlar arasında Tip 1 NOS (aynı zamanda b(beyin) ve n(nöronal) NOS olarak da adlandırılır) ve Tip 3 NOS (endotel hücrelerdeki, trombositlerdeki ve adrenal bezdeki EDRF/NO sentezinin çoğundan sorumludur) konstriktif izoformlardandır. Oysa Tip 2 (aynı zamanda mac (makrofaj) NOS olarak da adlandırılır) indüklenabilir bir izoformdur. Daha öncede üzerinde durulmuş olduğu gibi bu enzimler sitokrom p-450 redüktazinkine benzer dizilerle birlikte FAD, FMN ve NADPH içinde tanıma bölgeleri içerirler. Bütün izoformlar protein yoluyla fosforilasyon için ortak bir bölgeye sahiptirler. Tip 2 NOS aktivitesi, Ca^{+2} dan bağımsız olmasına rağmen tıpkı Tip 1 NOS gibi kalmodulin bağlama bölgesi içerir. Tip 2 NOS, Tip 1 NOS dan daha kısadır (1144 ve 1429 aminoasit). Bu amino ucundaki 200 aminoasit, karboksil ucundaki 15 aminoasidin yokluğuna ve molekülün içindeki 40 aminoasidin delesyonuna bağlıdır. Tip 1 NOS (beyin) ve Tip 3 NOS (endotelyum) arasında şaşırı derecede bir homoloji vardır ve bu endotel hücrelerinden beyin NOS'larına karşı geliştirilmiş anti serum ile NOS'a benzer bir immunoreaktivite tespit edildiğini açıklar (Bredt vd., 1990). Fakat her nasılsa Tip 1 NOS çözünebilir ama Tip 3 NOS partiküler halindedir ve bunlar farklı genler tarafından şifrelenirler (Janssens vd., 1992).

LPS (lipopolisakkarit) veya lenfokinlerle aktive olmuş makrofajlardaki indüklenabilir NOS, Tip 2 esas dizisinde kalmodulin bağlayıcı bir bölgesi olmasına rağmen aktivitesi için kalmoduline ihtiyaç duymaz (Lida vd., 1992). Son yıllardaki bulgular LPS ile muamele edilmiş sıçanların karaciğerlerindeki kalmoduline bağımlı NOS'un indüksiyonunu gösterecek bu şaşırı gözlemi kısmen de olsa açıklamaktadırlar. Tip 4 NOS'un Tip 2 NOS'a verimli olarak dönüşmesi Tip 2 NOS'un kökenini Tip 4 NOS'dan aldığını desteklemektedir.

Çizelge 2.1. NO sentazın izoformları

Tip	Kosubstrat Kofaktör	Düzenleme Şekli	Molekül Ağırlığı	Bulunduğu Doku
Ia(çözünabilir)	NADPH,BH ₄ FAD/ FMN	Ca ²⁺ Kalmodulin	155 kDA	Beyin, serebellum,N1E Nöroblastoma hücreleri
Ib(çözünabilir)	NADPH	Ca ²⁺ Kalmodulin	135 kDA	Endotelial Hücreler
Ic(çözünabilir)	NADPH,BH ₄ FAD/ FMN	Ca ²⁺ Kalmodulin	150 kDA	Nötrofiller
II(çözünabilir)	NADPH,BH ₄ FAD/ FMN	Bilinmiyor (endotoksin/sitokin tarafından indüklenmiş)	125 kDA	Makrofaj ve diğer hücreler
III(partiküler)	NADPH,BH ₄ FAD/FMN	Ca ²⁺ Kalmodulin	135 kDA	Endotelial hücreler
IV(partiküler)	NADPH	Bilinmiyor (endotoksin/sitokin tarafından indüklenmiş)	?	Makrofaj ve diğer hücreler

2.2.3- Nitrik Oksit Sentaz'ın İnhibitörleri

N^G-metil veya N-nitro L arginin türevlerinin, invitro ve invivo koşullarda NOS inhibisyonu yoluyla EDRF oluşumunu geçici ve yarışmalı olarak inhibe ettiği gerçeği, L arginin-NO yolunun tanımlanması için çok önemli bir adım olmuştur (Moncado vd., 1991). Bu analoglar invitro ve invivo koşullarda NOS aktivitesini inhibe etme yeteneklerinde çeşitli potansiyeller sergilerler. Son çalışmalarda bunların farmakolojik profillerinde başka önemli farklılıklar olduğu belirtilmelerine rağmen, diğer bir taraftan L-NAME (N nitro-L arginin metil ester) gibi N^G nitro L arginin türevleri NOS yoluyla L argininin L sitruline dönüşmesi esnasında NO ve O₂ üretimini aynı anda inhibe ederler, oysa L-NMMA (N monometil-L arginin) gibi N^G-metil-L arginin türevleri sadece NO sentezini inhibe ederler (Pouslov vd., 1992). Bu bulgu süperoksit dismutaz'ın L-NMMA'nın vazokonstrüktör etkilerinde önemli derecede neden azalttığını açıklayabilir ve O₂⁻'nin L-NMMA'nın vasküler etkilerinde yer alabileceğini düşündürür (Thomas ve Ranwel, 1992).

NOS inhibitörleri, hayvanlarda lipopolisakkaritlerle veya tümör nekroz faktörleriyle indüklenen hipotansiyonu ve hemorajik ve anaflaktik şoklu hayvanlardaki hipotansiyonu

tersine çevirebilir veya önleyebilir (Moncado, 1992). Septik şoklu hastalarda düşük dozlardaki N^G-monometil-L arginin (standart terapiye eklenmiş olan) bu koşullardaki hipotansiyonu tersine çevirmiştir (Petros vd., 1991). Ancak deney hayvanları ile yapılan çalışmalar, NOS'un inhibisyon derecesinin tedavinin sonucu için çok önemli olduğunu düşündürmektedir. Çünkü yüksek dozlar şiddetli vazokonstrüksiyonlara, organ hasarına ve ölümlere neden olmaktadır.

Endotoksin ayrıca venöz kaslardaki (Wallance ve Moncado, 1993), miyokard ve endokarddaki NOS'u indükler (Shulz vd., 1992). Bu enzim tarafından NO sentezinin artması venöz havuzlaşmaya ve endotoksemiyle alakalı kardiyak fonksiyon bozukluklarına katkıda bulunuyor olabilir. Dahası dilate olmuş kardiyomiyopatinin kardiyak fonksiyon bozuklukları, aynı zamanda bu enzimin indüksiyonu ile de bağlantılıdır (de Belger vd., 1993). Bu sebepten damarda da olduğu gibi kalpte de fizyolojik bir role sahip olabilir ve miyokard da normalde bulunan bir enzim tarafından fizyolojik olarak üretileceği gibi indüklenebilen enzim tarafından çok miktarda ve uzun süre üretildiği zaman da patolojik olup dilatasyona ve damar hastalıklarına neden olabilir.

2.3- Nitrik Oksitin Fizyolojik Etkileri

NO, lipofilik bir maddedir. Bu nedenle vasküler endotelden düz kas hücrelerine kolaylıkla difüze olarak guanilat siklaz enziminin hem grubuna bağlanır. Bu enzimi aktif hale getirip düz kas hücrelerinde cGMP düzeyini yükseltir. cGMP miktarının artması vasküler düz kas hücrelerinde gevşemeye ve trombosit adezyon ve agregasyonunun inhibisyonuna neden olur (Moncado ve Higgs, 2002).

İnsanlarda NO, bazal durumda damar endotelinden sürekli olarak salıverilir ve oluşturduğu vazodilatör etki ile damar rezistansının düzenlenmesine katkıda bulunur. L-NMMA verilerek NO sentezinin inhibe edilmesinin sıçan, kobay ve tavşanlarda kan basıncını yükselttiği bulunmuştur. Bu olay L-arginin verilerek tersine çevrilebilir.

Venlerin, arterlere göre genellikle daha düşük miktarlarda NO salıverdikleri bulunmuştur. Nitekim, koroner bypass ameliyatlarında yerleştirilen a. mammaia interna greflerinin, safen venden yapılanlara göre daha uzun bir süre tıkanmadan kalması, arter endotelinin NO sentez ve salıverme kapasitesinin venlere nazaran daha yüksek olması ile açıklanmıştır (Kayaalp, 1990).

NO bazal vasküler tonusun sağlanmasına ilaveten, trombosit aktivasyonunun önlenmesinde, endotele lökosit adezyonunun sınırlandırılmasında ve miyokard kontraktilitesinin regülasyonunda önemli role sahiptir. Bu nedenle, NO yetersizliğinde deney hayvanlarında hipertansiyon, ateroskleroz ve diyabet gibi hastalıkların daha hızlı geliştiği gösterilmiştir (Busse ve Fleming, 1996). NO'nun fibroblastlarda ve kültürü yapılan düz kas hücrelerinde mitozu inhibe ettiği bulunmuştur. Bu antiproliferatif etki NO'nun ateroskleroz gelişimini önleyici etkisine katkıda bulunabilir.

NO, oldukça selektif ve etkin bir şekilde pulmoner vazodilatasyon sağlar. Bu nedenle, pulmoner hipertansiyonlu yeni doğanlarda, konjenital kalp hastalıklı çocuklarda, pulmoner hipertansiyonlu yetişkinlerde, konjenital alveolar ve bronkopulmoner displazide inhalasyon yoluyla kullanımı gündeme gelmiştir (Kinsella ve Abman, 1993).

Beyinde belirli nöronlarda NO sentezlenmesi, bu maddenin nörotransmitter işlevi yapabileceğini de düşündürmektedir (Bredt ve Snyder, 1992). Deney hayvanlarında elde edilen sonuçlar NO sentezinin engellenmesi ile öğrenme yeteneğinin azaldığını ortaya koymaktadır. NO'nun görme, koklama, ağrı ve açlık duygusunu algılamada da rolü olabileceği bildirilmiştir (Moncado ve Higgs, 2002). Otonom sinir sistemi ile ilişkili bir periferik "nitrejik" sistemin varlığını ortaya koyan kanıtlar da elde edilmiştir.

NO bilinen diğer klasik nörotransmitterlerden farklıdır, gerektiği yerde, zamanda ve miktarlarda sentezlenerek üretildiği hücreden dışarıya difüze olur, özel reseptörleri yoktur.

Gastrointestinal sistemde, nöronal yapılarda ve pleksuslarda NOS-enziminin varlığının gösterilmesi NO'nun bu sistemde gevşetici tonusa katkıda bulunduğunu ortaya koymaktadır. Nitekim, pilor stenozunda ve akalazia olgularında adı geçen enzimin kaybolduğu ve dolayısıyla NO sentez ve salıverilmesinin gerçekleşmediği saptanmıştır (Anggard, 1994).

Pankreasta β - hücrelerinde cNOS bulunduğu ve fizyolojik şartlarda NO'nun insülin salgılanmasına neden olduğu bilinmektedir. Rodentlerde streptozosin verilerek oluşturulan diyabette Ca^{+2} 'a bağımlı NOS inhibitörleri verilmesi durumunda pankreasta makrofaj infiltrasyonunun azaldığı ve hipergliseminin önlendiği saptanmıştır (Corbett vd., 1993).

İnsanda uterus arterlerinde internal kalınlığın oluşumunda NO üretim ve salıverilmesinin rol oynadığı gösterilmiştir. Bu etkiye ilaveten NO'nun, uterus kasılma ve gevşemede de rolü olduğu öne sürülmüştür (Azuma vd., 1995).

NO, yukarıda belirtilen organ sistemleriyle ilgili önemli etkilerine ilaveten, immün sistemde de bazı fonksiyonların kontrolüne katkıda bulunur. Nitekim makrofajların kanser hücrelerini öldürme yeteneklerini de kapsayan sitotoksik etkileri için NO'nun gerekli olduğu gösterilmiştir. Akut ve kronik iltihap olaylarında da NO'nun önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Nitekim, NO'nun iltihap dokusunda makrofajlar tarafından fazla miktarlarda sentezlenip salıverildiği bulunmuş ve böylece makrofajların infeksiyon etkeni mikroorganizma ve parazitler üzerindeki öldürücü etkilerine aracılık ettiği bildirilmiştir (Edwards, 1995).

Sonuç olarak; bir otakoid özelliğine sahip olan NO'nun güçlü bir vazodilatör olduğunu ve bu temel etkisine ilave olarak nörotransmitter, immünomodülatör ve yabancı etkenlere karşı sitotoksik etki gösterdiğini söylemek mümkündür.

2.4- Canlılarda Oksijen Radikallerinin Yapımı

Oksijen bulunan bir ortamda, çeşitli fiziksel ve kimyasal etkenlerle oksijen radikalleri yapılabilir. Vücudumuzda oluşabilen radikallerin sayısı "yüzlerce farklı tür" şeklinde ifade edilebilirse de, bu radikaller arasında süperoksit, hidrojenperoksit, nitrik oksit ve hidroksil radikalinin özel yerleri vardır. Hatta bu radikaller içinde süperoksit ve nitrik oksit temel radikaller sayılabilir. Çünkü süperoksit ve nitrik oksit enzimatik mekanizmalarla, devamlı olarak ve önemli derişimde üretilen radikallerdir. Ayrıca bu iki radikal, biyolojik sistemlerde tanıdığımız diğer bütün önemli radikaller ile radikal yapıda olmayan reaktif türlerin oluşumunu başlatabilecek özelliktedirler.

Normal biyokimyasal tepkimeler sırasında oluşan oksijen radikalleri ile çeşitli biyolojik fonksiyonları yerine getirmek üzere üretilen nitrik oksidin derişimleri genellikle çok düşüktür. Düşük derişimdeki reaktif türler, hücrelerin antioksidan sistemleri tarafından inaktive edildiklerinden önemli toksik etkilere neden olmazlar. Ancak bu radikallerin yapımları çeşitli patolojik durumlarda artabilir, çoğunlukla da her iki radikal bileşik grubunun oluşumu birbiri ile paralel seyreder. Örneğin inflamasyon durumlarında aktive olan lökositler aynı anda hem oksijen radikallerini hem de nitrik oksidi yüksek derişimlerde sentezlerler. Nitrik oksit, oksijen radikalleri ile tepkimeye girerek veya oksijenli ortamlarda oksitlenerek, kendisinden çok daha reaktif türlerin oluşumuna neden olur. oksijen radikallerinin fazla yapımının neden olduğu etkilerin toplamı "oksidan stres" diye adlandırılır. Oksidan stresi, nitrik oksidin reaktif türlerinden kaynaklanan toksik etkilere ayırmak mümkün olmadığından, "nitrozatif stres"

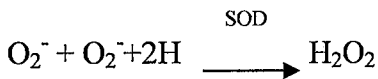
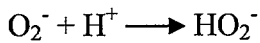
den ayırmak imkansızdır. Bu bakımdan, oksidatif hasar, superoksitten kaynaklanan radikaller ile nitrik oksidin reaktif türlerinin neden olduğu hasarların bir toplamıdır.

2.4.1- Süperoksit Radikali

Canlılarda oluştuğu ilk gösterilen radikal olan süperoksit, başlıca şu mekanizmalarla üretilmektedir:

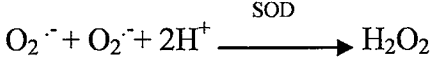
- İndirgeyici özellikteki biyomoleküller oksijene tek elektron verip kendileri oksitlenirken süperoksit radikali oluşur. Hidrokinonlar, flavinler, tiyoller, katekolaminler, ferrodoksinler, indirgenmiş nükleotidler gibi yüzlerce biyolojik molekül aerobik ortamda oksitlenirken süperoksit yapımına neden olurlar.
- Başta çeşitli dehidrogenazlar ve oksidazlar olmak üzere, yüzlerce enzimin katalitik etkisi sırasında süperoksit radikali bir ürün olarak oluşabilir.
- Mitokondrideki enerji metabolizması sırasında oksijen kullanılırken, tüketilen oksijenin % 1-5 kadarı süperoksit yapımı ile sonlanır. Buradaki radikal yapımının nedeni NADH-dehidrogenaz ve koenzim-Q gibi elektron taşıyıcılardan oksijene elektron kaçağının olmasıdır.
- Aktive edilen fagositik lökositler bol miktarda süperoksit üreterek fagozom içine ve buldukları ortama verirler. Antibakteriyel etki için gerekli olan bu radikal yapımı, daha reaktif türlerin oluşumunu da başlatır. Yani radikal yapımı bazı hücrel fonksiyonlar için gerekli de olabilir.

Hücrel koşullarda üretilen süperoksit, oksitleyici veya indirgeyici olarak davranabilir. Aldığı elektronu metal iyonuna, sitokrom c'ye veya bir radikale verirse tekrar oksijene oksitlenir. Oksijenden daha oksitleyici olan süperoksit bir elektron daha alırsa peroksi anyonuna indirgenir.



Bu tepkime biyolojik moleküllerin oksidasyonuna neden olduğundan tercih edilmez. Aerobik canlılarda süperoksitlerin H_2O_2 'e çevrilmesi katalitik aktivitesi çok yüksek bir enzim olan süperoksit dismutaz (SOD) tarafından katalizlenir.

Süperoksit Dismutaz (SOD)



SOD tarafından katalizlenen bu tepkime “dismutasyon tepkimesi” diye adlandırılır. Süperoksit, özellikle hafif asidik koşullarda SOD olmadan kendiliğinden dismutasyonla da H_2O_2 'e çevrilebilir.

SOD enziminin yüksek katalitik etkisi nedeniyle hücrelerde süperoksit birikimine izin verilmez. Ancak çeşitli patolojik durumlarda süperoksit yapımının artmasıyla süperoksitde özgü tepkimeler görülmeye başlar:

- Süperoksit metal iyonlarını indirgeyerek bağlı olduğu proteinlerden salınımına neden olur. kofaktörlerin oksidasyon düzeylerini bozar ve metal iyonlarının katıldığı hidroksil radikali yapım tepkimelerini hızlandırır.
- Diğer radikallere göre daha az reaktif olsa da indirgenmiş nükleotidleri, bazı amino asitleri ve antioksidan bileşikleri oksitler.
- Süperoksit, hücre zarlarının hidrofobik ortamlarında daha uzun ömürlüdür ve çözünürlüğü daha fazladır. Zar fosfolipidleri nedeniyle hücre zarı yüzeyleri daha asidiktir ve süperoksit burada daha kolayca bir proton alarak hidroperoksit radikalini (HO_2^{\cdot}) oluşturur. Bu radikal de çok reaktif olup, hücre zarlarında lipid peroksidasyonunu başlatabilir ve antioksidanları oksitleyebilir.

2.4.2- Hidrojen Peroksit

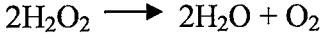
Hidrojen peroksit, oksijenin enzimatik olarak iki elektronla indirgenmesi ya da süperoksitlerin enzimatik ve non-enzimatik dismutasyonu tepkimeleri sonucu oluşur.

Yapısında paylaşılmamış elektron içermediğinden radikal özelliği taşımaz, reaktif bir tür değildir. Hidrojen peroksidin oksitleyici bir tür olarak bilinmesinin nedeni, demir, bakır gibi metal iyonlarının varlığında hidroksil radikalinin öncülü olarak davranmasıdır.

Hidrojen peroksit özellikle proteinlerdeki hem grubunda bulunan demir ile tepkimeye girerek yüksek oksidasyon düzeyindeki reaktif demir formlarını oluşturur. Bu formdaki demir çok güçlü oksitleyici özelliklere sahip olup, hücre zarlarında lipid peroksidasyonu gibi radikal tepkimeleri başlatabilir.

Oksitleyici özelliği nedeniyle, biyolojik sistemlerde oluşan H_2O_2 'nin derhal ortamdaki uzaklaştırılması gerekir. H_2O_2 , memeli hücrelerinde katalaz, ve glutatyon peroksidaz (GSHPx) tarafından glutatyon redüksiyonu ile su ve moleküler oksijene detoksifiye edilir. Okside

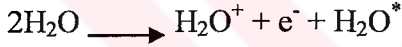
glutasyon da nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) varlığında glutasyon redüktaz (GR) ile redükte glutatona dönüştürülür.



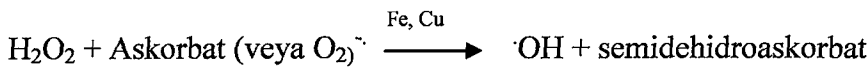
2.4.3- Hidroksil Radikali

Biyolojik ve kimyasal sistemlerde üretilen hidroksil radikali ($\cdot\text{OH}$) canlılarda iki mekanizma ile oluşabilir.

- İyonlaştırıcı radyasyonun etkisi ile sulu ortamda su moleküllerinin iyonlaşması gerçekleşir. Uyarılmış su molekülü (H_2O^*) homolitik yıkım ile; H_2O^+ ise bir su molekülü ile tepkimeye girerek hidroksil radikali oluştururlar. Bu tepkimeler çok kısa sürede gerçekleşir ve üretilen $\cdot\text{OH}$, radyasyonun canlılardaki toksik etkisinden sorumlu başlıca kimyasal türdür.

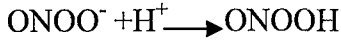
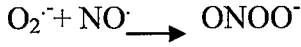


- Hidrojen peroksitin eksik indirgenmesi ile $\cdot\text{OH}$ yapımı, vücutta bu radikalın en önemli kaynağıdır. H_2O_2 'nin iki elektron ile indirgenmesi ile su oluşurken, tek elektron ile indirgenmesi $\cdot\text{OH}$ yapımına neden olur. bu tür indirgenme Fe, Cu gibi metal iyonları tarafından katalizlenir. Askorbik asit, süperoksit gibi indirgeyici bileşiklerin de bulunduğu ortamda oksitlenen metal iyonu tekrar indirgendiğinden H_2O_2 'den $\cdot\text{OH}$ yapımı sürekli bir duruma gelir.



Haber-Weiss tepkimesi ya da fenton tepkimesi olarak adlandırılan bu tepkime ile ne kadar $\cdot\text{OH}$ oluşacağı, vücutta üretilen H_2O_2 derişimi ve serbest metal iyonunun varlığına bağlıdır. Süperoksit hem H_2O_2 'nin öncülü hem de metalleri indirgeyici bir tür olduğundan; süperoksit proteinlere bağlı metallerin indirgenip serbest kalmasına da neden olabildiğinden, biyolojik koşullarda süperoksit oluşumunun arttığı ortamda $\cdot\text{OH}$ üretimi kaçınılmazdır. Fenton tepkimesini katalizleyen en aktif metal iyonları demir ve bakırdır.

Hidroksil radikali oluşumu için diğer bir yol ise O_2^- in nöronal endothelial ve glial nitrikoksit sentaz aracılığı ile sürekli oluşan ve bir gaz radikal olan nitrik oksit ile girdiği reaksiyondur. Bu reaksiyon ürünü peroksinitrittir (ONOO^-).



Biyolojik sistemlerin tanıdığı en reaktif tür olan $\cdot\text{OH}$, su dahil ortamda rastladığı her biyomolekülle tepkimeye girer. Hidroksil radikalinin tepkimeleri başlıca:

- Elektron transfer tepkimeleri
- Hidrojen çıkarma tepkimeleri
- Katılma tepkimeleri

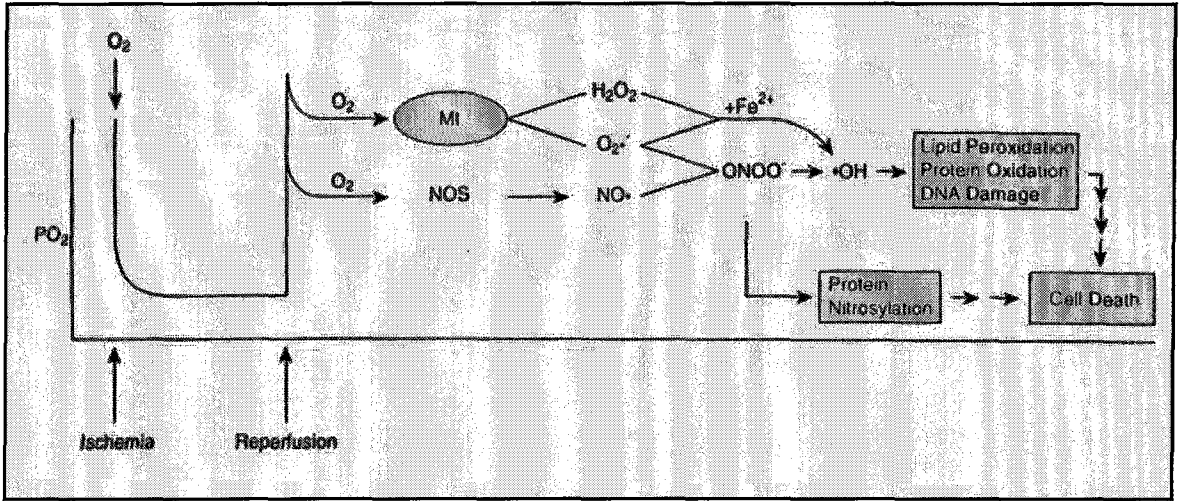
Bütün bu tepkimeler, $\cdot\text{OH}$ 'ın paylaşılmamış elektron içeren dış orbitaline elektron alma ilgisinden kaynaklanır.

Katılma tepkimeleri, özellikle elektronca zengin moleküllerle (pürin ve primidin bazları, aromatik amino asitler gibi) gerçekleşir.

Hidroksil radikalinin organik moleküllerden hidrojen atomu alarak suya indirgendiği tepkime, hidrojen çıkarma tepkimesi olarak bilinir. Hidroksil radikali ile oluşan en iyi tanımlanmış biyolojik hasar, lipid peroksidasyonu olarak bilinen serbest radikal zincir reaksiyonudur.

Her tür biyolojik molekül $\cdot\text{OH}$ 'ın bir hedefi ise de özellikle elektronca zengin bileşikler tercihli hedeflerdir. Nükleik asitler, proteinler ve lipidlerde başlatılan radikalik tepkimelerde binlerce farklı ara ürünler oluşabilir.

- DNA ile tepkimesi sonucu baz modifikasyonları, baz delesyonları, zincir kırılmaları gerçekleşebilir. İleri derecedeki DNA hasarları tamir edilemediğinden hücre ölümüne neden olur.
- Proteinler üzerinde oluşan oksidasyonlar yapı değişimine neden olacağından proteinleri proteolitik yıkıma götürür.
- Hücre zarı, su içermediğinden $\cdot\text{OH}$ 'ın başlıca hedefi yağ asididir. Zar lipidlerinin peroksidasyonu zarın yapısını bozar ve geçirgenliğini artırıp yine hücre ölümüne neden olabilir.
- Özellikle $\cdot\text{OH}$ yapımını katalizlemelerindeki etkileri nedeniyle, canlılarda metal iyonların radikal hasarlarından birinci derecede sorumludurlar ve bu etkiye sahip olmadıkları formda (proteine bağlı) tutulmalıdır.



Şekil 2.6 Hidroksil radikallerinin hücrede lipid peroksidasyonu, protein oksidasyonu ve DNA hasarını başlatması.

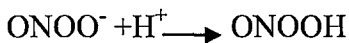
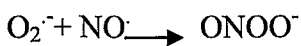
2.4.4- Bir Radikal Olarak Nitrik Oksit

Nitrik oksit, çok önemli biyolojik fonksiyonları yerine getirmek üzere üretilen nitrojen merkezli bir radikaldir. Paylaşılmamış elektron aslında nitrojen atomuna ait ise de, bu elektronun hem nitrojen hem de oksijen atomu üzerinde delokalize olması nedeniyle tam radikal özelliği taşımaz. Bunun sonucu, bilinen diğer radikallere göre reaktivitesi baskılandığından oldukça uzun ömürlüdür.

Oksijen radikalleri, çok sayıdaki enzimatik ve enzimatik olmayan yollar ile fiziksel/ kimyasal mekanizmalarla oluşturulurlar. Oysa vücudumuzda NO sentezini sağlayan mekanizmalar son derece kısıtlıdır. Vücuda giren nitro bileşiklerinin metabolize edilmesi sırasında oluşan NO bir tarafa bırakılacak olursa, endojen NO oluşturan tek kaynak nitrik oksit sentaz (NOS) enzimidir. Bu enzimin nöronal, endotelial ve indüklenebilir olmak üzere 3 formu vardır.

Radikal olarak reaktivitesi düşük olan NO, metal içeren merkezler ve radikaller ile büyük bir hızla tepkimeye girer. Özellikle lipid radikaller ile tepkimeye girmesi NO'ye antioksidan bir etki de kazandırır.

$O_2^{\cdot-}$, nöronal endothelial ve glial nitrikoksit sentaz aracılığı ile sürekli oluşan ve bir gaz radikal olan nitrik oksit ile reaksiyona girer. Bu reaksiyonun ürünü peroksinitrittir ($ONOO^{\cdot-}$).



Son derece hızlı gerçekleşen bu reaksiyonda ONOO^- oluşum hızı $6.7 \times 10^9 \text{ L. mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ olup difüzyon sınırlıdır (Hue and Padmaja., 1993). Fizyolojik pH da ONOO^- derhal OH^- ve nitrojen dioksit (NO_2^-) parçalanır. Çok güçlü bir prooksidan olan ONOO^- , SOD ile reaksiyona girerek güçlü bir nitratlayıcı ajan oluşturur. Sonuçta hücrel proteinlerin tirozin kalıntılarının nitratlanması hücrel disfonksiyon ve ölüme yol açabilir (Beckman vd., 1993; Patel vd., 1999).

Fizyolojik değişimde üretilen NO, esas olarak oksihemoglobin tarafından nitrat (NO_3^-) oksitlenerek aktivitesi sonlandırılır. Oksijen radikallerindeki durumun aksine, nitrik oksidi ortamdaki temizleyen herhangi bir özel enzim yoktur. Aerobik ortamda NO stabil değildir. Derişiminin artması ile oksidasyonu hızlanır. Bu nedenle ortamdaki derişimi ile kendi ömrü arasında ters bir orantı vardır.

Radikalik tepkimeler şu durumlarda sona erer.

- Oluşan radikallerin antioksidanlar ile indirgenmesi
- Radikallerin birbirleri ile tepkimeleri
- Ortamda tepkimeye girebilecek bileşik kalmaması

Buna göre hücrel koşullarda, oluşan radikalın çok erken safhalarda indirgenmesi biyomoleküllerin korunması bakımından hayati öneme sahiptir.

Çizelge 2.2 Enzimatik ve non - enzimatik oksidanlar

ENZİMATİK ANTIÖKSİDANLAR	NON-ENZİMATİK ANTIÖKSİDANLAR
Süperoksit dismutaz	Redükte glutasyon
Katalaz	Tioller
Glutasyon peroksidaz	Vitamin C
Glutasyon redüktaz	Vitamin E
	β -karoten
	Diğer non-enzimatik antioksidanlar

Serbest radikaller çeşitli hastalıkların patogeneğinde önemli rol oynarlar. Diabet ve diabet komplikasyonlarının gelişimi, kanser, yaşlılık, Behçet hastalığı gibi çok sayıda hastalıkta serbest radikal üretiminin arttığı ve antioksidan savunmaların yetersiz olduğu gösterilmiştir.

Ancak bu hastalıkların çoğunda, serbest radikallerin hastalığın bir sebebi mi, yoksa bir sonucu olarak mı meydana geldikleri bilinmemektedir.

2.5- Beyin İskemi Reperfüzyon Hasarı

Beyinde iskemik dokunun resirkülasyonu ile meydana gelen doku hasarı, iskemi sırasında gelişen olayların kümülatif etkileri sonucu ortaya çıktığı için "iskemi-reperfüzyon hasarı" şeklinde adlandırılır. Reperfüzyon döneminde, iskemi sırasında nekroza uğramış hücrelerin dışındaki diğer hücrelerde, önce ATP yapımı, iyon dengesi geriye dönmekte, membranlar repolarize olmakta, sinaptik aktivite ileride gecikmiş nöronal hasar nedeniyle ölecek hücrelerde dahi düzelmekte, ancak hem metabolik hız hem de kan akışı uzun süre belirgin derecede azalmaktadır (Imaizumi vd., 1987; Siesjo vd.,1995).

Reperfüzyon ile hücreye yeniden enerji sağlanması, metabolik açıdan uzun dönemde yararlı olmakla birlikte, ilk dönemde iskemik hasarlı doku üzerine ani ve hızlı biçimde gelen oksijen ve kan ürünleri hasarı büyütülmektedir (White vd.,1993). Reperfüzyon döneminde iskeminin derinliği ve süresine bağlı olarak, hücrenin temel yapı ve fonksiyonlarında değişik derecelerde hasar oluşmaktadır. Bu hasarı oluşturan en önemli etkenlerin serbest oksijen radikalleri ve diğer reaktif oksijen türleri olduğu kabul edilmektedir (Suzuki, 1987; Bindokas vd., 1996; Chan , 1996; Toyoda ve Lee, 1997)

Morfolojik çalışmalar korteksin 3 ve 5 inci tabakalarında bulunan piramidal nöronların ve hipokampusta Ammon boynuzunun CA1 bölgesinde bulunan nöronların iskemi- reperfüzyon hasarından en fazla etkilenen bölgeler olduğunu ortaya koymaktadır. Reperfüzyonun ilk 15 dakikasında nöronlarda morfolojik olarak gözlenen hasar mikrovakuolizasyondur. Sonraki altı saat içinde hasar ilerler ve 48-72 saat sonra nöron parçalanması görülür (Bindokas vd., 1996).

İskemik dokunun reperfüzyonu sırasında gerçekleşen reoksijenasyon bir yandan nöronal canlılığın devamını sağlarken diğer yandan da reaktif oksidanların oluşumuna yol açan sayısız enzimatik oksidasyon reaksiyonu için substrat olarak gerekli olan oksijeni ortama getirmektedir. Oksijenin indirgenmesini izleyen dönemde süperoksit (O_2^-), hidroperoksit (HO_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali ($\cdot OH$) nin dahil olduğu birçok reaktif oksijen türü oluşmaya başlar.

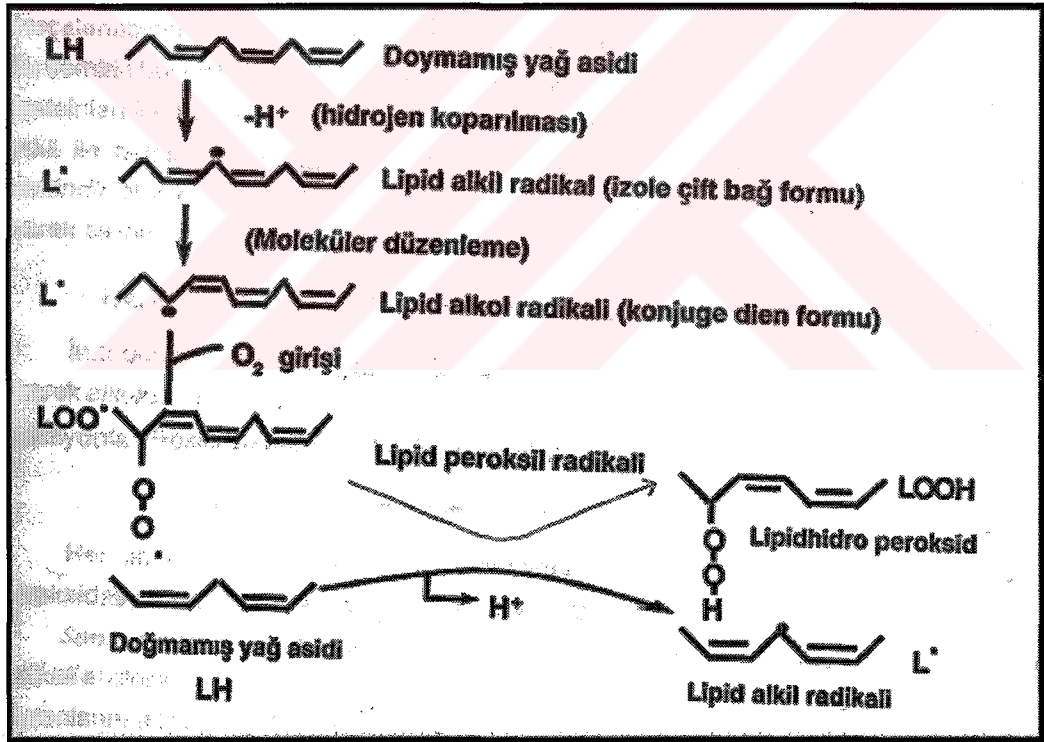
Dokuda meydana gelen başlıca İskemi-Reperfüzyon hasarları şunlardır;

- Lipid peroksidasyonu
- Lipid karboksilasyonu
- Protein oksidasyonu

- DNA hasarı
- Nötrofil kaynaklı hücre hasarı

2.5.1- Lipid Peroksidasyonu

Reperfüzyon hasarının en önemli nedeni, artan serbest radikallerin beyin hücresi, plazma ve organel membranları, vasküler endotel hücre membranı ve myelinde başlattıkları lipid peroksidasyonudur. Radikal aracılı bir zincir reaksiyon mekanizması şeklinde gelişen lipid peroksidasyonu sırasında, doymamış yağ asidlerinin yan zincirlerinde yeniden düzenlenme söz konusudur (White vd.,1993). Lipid peroksidasyonu sırasında ilk hidrojen atomunu koparacak reaktivitedeki radikaller, hidroksil (OH^\cdot), alkoksil (RO^\cdot), peroksil (ROO^\cdot) ve hidroperoksil radikalleri olup, süperoksit anyonu ve hidrojen peroksit bu reaksiyonu başlatmamaktadır (Gutteridge, 1995).



Şekil 2.7 Lipid peroksidasyonu

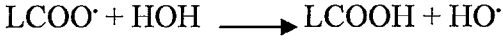
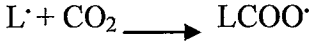
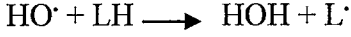
İskemide başlayan lipolizin, reperfüzyon süresince de devam ettiğine dair kanıtlar bulunmaktadır. Bu nedenle reperfüzyonda, enzimatik lipoliz ve lipid peroksidasyonu, membran hasarında sinerjizm içinde sürmektedir. Perokside olmuş yağ asidleri, lipolizi gerçekleştiren fosfolipazlar için doğal yağ asidlerine oranla daha iyi substratlardır. Ayrıca lipid peroksidasyon ürünleri de fosfolipaz aktivitesini stimüle etmektedirler (White vd.,

1993). Lipid peroksidasyonu, ortamda doymamış yağ asitleri, oksijen ve metal katalizörler (Fe^{2+} , Cu^{+}) bulunduğu sürece logaritmik olarak artarken yeni serbest radikallerin oluşumuna neden olmaktadır. Bu nedenle reperfüzyon dönemi, lipid peroksidasyonu için gerekli koşulları sağlaması bakımından çok uygundur (Krause vd.,1985;White vd., 1993). Lipid radikalleri veya MDA gibi peroksidasyon ürünleri aracılığı ile lipid peroksidasyonu, biyolojik membranlarda yaygın hale geldiği zaman hücresel yapı ve fonksiyon hasarları ortaya çıkmaktadır. Lipid peroksidasyonu sonucu ortaya çıkan ve fonksiyonel hasara neden olan temel yapısal değişiklik; membran yağ asitlerinin interior alkil zincirlerine hidrofilik bir grubun girmesi ve yağ asitlerinin aköz faza doğru dönmeleridir. Bunun sonucunda oluşan fonksiyonel hasarlar şunlardır:

- Yapısal hasarın derecesine göre, plazma membranında akışkanlığın azalması, membran geçirgenliğinin değişmesi, membran potansiyeli azalması, membrana bağlı enzimlerde (Örn: $Na^{+}-K^{+}ATPaz$) aktivite azalması (Esterbauer ve Schaur, 1999).
- Lizozomal ve mitokondrial membranları ilgilendiren ileri derecede lipid peroksidasyonu ile organel içeriğinin (mitokondrial matriks enzimleri, lizozomal enzimler gibi) hücre içine salınması. Normal koşullarda lizozomlar içinde güvenli bir şekilde tutulan lizozomal proteolitik enzimlerin sitoplazmaya salınmaları ile hücre içi proteolizin hızlanması ve doku hasarının şiddetlenmesi (İşlekel vd., 1999).
- Membran geçirgenliğinin bozulması ile protein sentezi için çok önemli olan K^{+} ve Mg^{2+} konsantrasyonlarının değişmesi ve buna bağlı olarak protein sentezinin inhibisyonu.
- Lipid peroksidasyonunun yıkılım ürünü olan malondialdehidin, proteinlerin amino grupları ile şift bazı oluşturması ve tiyol grupları ile etkileşim. Bu şekilde oluşturduğu protein fragmentasyonu ve polimerizasyonunun yanısıra MDA nın mutajenik etkisi de gösterilmiştir (Krause vd., 1985; Rice ve Evans, 1994).

2.5.2- Lipid Karboksilasyonu

Reperfüzyonda ortaya çıkan serbest radikallerin etkisi ile oluşan lipid radikali, dokuda artmış bulunan karbondioksit ile reaksiyona girerek lipid karboksil radikalini oluşturmaktadır. Karboksil radikali, lipid peroksidasyonu kadar yaygın olmasa da membran hasarına katkıda bulunmaktadır (Halliwell, 1999).



2.5.3- Protein Oksidasyonu

Hücrenin protein yapıları, serbest radikallerin, özellikle duyarlı amino asitler ile direkt etkileşimi sonucunda hasara uğramaktadır. Protein fonksiyonu için kritik pozisyonda olan amino asitler (Örn: enzimin aktif bölgesindeki amino asitler), özellikle radikal hasarına duyarlıdır. Metionin, sistein gibi terminal sülfidril (-SH) grubu bulduran amino asitler ile triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin gibi aromatik amino asitler, oksidasyona en fazla maruz kalmaktadırlar. Oksidasyon sonucu proteinlerin sekonder ve tersiyer yapılarında oluşan değişiklikler fonksiyonlarını etkilemektedir (Rice ve Evans, 1994). Enzim veya reseptör fonksiyonuna sahip membran proteinleri, özellikle serbest radikallerin modifikasyonlarına duyarlı oldukları için protein oksidasyonu ile önemli hücresel ve membran fonksiyonları bozulmaktadır (Kilgore ve Lucchesi, 1993,1995). Protein yapılarındaki hasarın gösterilmesi için, protein karbonlarının belirlenmesi yaygın olarak kullanılan bir göstergedir. Son yıllarda protein bağlı okside amino asitlerin; özellikle aromatik ve sülfidril içeren kalıntıların analizi yapılmaktadır (Witko, 1996; Halliwell, 1999). Bunun yanısıra iskemi-reperfüzyon sürecinde hücre içi enzimlerden olan antioksidan enzimlerin oksidasyonları da bu enzimlerin aktivitelerindeki azalmanın nedenlerinden birini oluşturabilmektedir (McCord , 1993; Darley vd., 1995; İşlekel vd., 1999).

2.5.4- DNA Hasarı

Reaktif oksijen radikallerinin, hücrede saldırdığı bir diğer önemli makromolekül nükleik asitlerdir. Kalıtsal bilgiyi taşıyan deoksiribonükleik asidin (DNA) temel taşı olan nükleotidin yapısı içinde yer alan purin ve pirimidin bazıları oksijen radikallerinin etkilerini gösterdiği bölgelerdir. Özellikle guanin bazının bu radikaller aracılığı ile hidroksilasyonu sonucunda DNA molekülünün yapısı değişmekte ve mutasyonlar ortaya çıkmaktadır (Kitagawa vd., 1990; Athar vd., 1993; Kilgore ve Lucchesi, 1993; Pedersen ve Finazzi, 1993). DNA yapısında 100 den fazla modifikasyon tanımlanmıştır, ancak sadece guanozinin 8-hidroksilasyonu yaygın olarak çalışılmaktadır (Collins vd., 1996; Frei, 1999) . Beyinde temel makromoleküller genetik yapılara olan hasar nedeniyle kreatin kinaz-BB (CK-BB), tubulin,

nöron spesifik enolaz (NSE) gibi beyin proteinlerinin sentezinin azaldığı ortaya konmuştur (White vd., 1993).

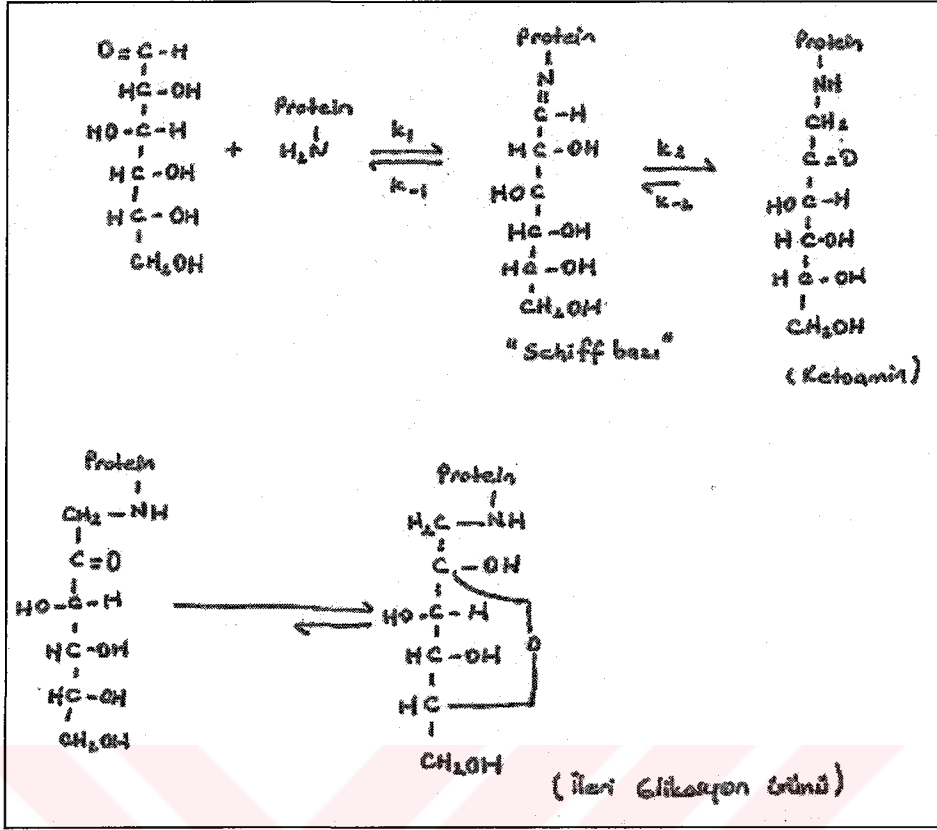
2.5.5- Nötrofil Kaynaklı Hücre Hasarı

İskemik dokuda, serbest radikaller de dahil olmak üzere diğer bazı kemoatraktanların etkisi ile göç eden nötrofiller, aşağıdaki mekanizmalar ile reperfüzyonda doku hasarının ilerlemesine yol açmaktadırlar:

- Salgıladıkları proteazlar (elastaz, jeletinaz vb.) ile endotel hücre parçalanmasına neden olurlar.
- Reperfüzyon döneminin en önemli mikrovasküler patolojisi olan kan akışının geri dönmemesi fenomenine (no reflow phenomen), aktive olmuş nötrofillerin yol açtığı ve nötrofillerin kapillerlerindeki agregasyonları ile kan akımının geri dönmeye engel olan kapiller tıkaçları oluşturduğu bildirilmiştir (Okada vd., 1994) .
- Salgıladıkları vazokonstrüktör ajanlar ve trombosit aktive edici faktör (PAF) ile daha büyük damarlarda da (arteriyol, prekapiller damarlar) daralmaya neden olmaktadır.
- Bir araşidonik asid metaboliti olan LTB₄ salgılayarak, süperoksid anyon radikali üretimine ve nötrofillerin kemotaksisine neden olmaktadır. Böylece bir geri beslenme mekanizması ile toplanmış olan nötrofillerden salgılanan kemotaktik faktörler yeniden serbest radikal üretimine ve nötrofil infiltrasyonuna neden olmaktadır (Kilgore ve Lucchesi, 1995). Hartmann ve ark (Hartmann vd., 1994) nötrofillerce üretilen süperoksid anyon radikalininin, eritrositlerin agregasyonunu da hızlandırdığını ve bu etkinin nötrofil agregasyonu ile birlikte kapiller tıkanmayı daha arttırıcı olabileceğini savunmuşlardır.

2.6- Diabette Glikasyon Ürünlerinin Oluşumu

Plasma ve hücre membran proteinleri uzun süre yüksek konsantrasyonda glukozla karşı karşıya kalırsa glukoz hızla proteinlerin amino gruplarına nonenzimatik bir yolla bağlanır, bu olaya 'non-enzimatik glikasyon' denir. Proteinlerin N terminal α amino gruplarına ve içerdiği lizin aminoasitlerine ait 2. Amino grubuna özellikle glukoz ve ayrıca galaktoz, fruktoz, mannoz, fukoriboz, sialik asit ve bazı durumlarda bu heksozların fosforillenmiş şekilleri bağlanır. Bağlanma karbonhidrat kısmının karbonil grubu ile proteinin amino grubu arasında önce bir aldimin (Shiff baz) oluşması ve bundan da Amodari reaksiyonu sonucunda ketoamin haline geçmesi ile gerçekleşir.



Şekil 2.8 Proteinlerin glikasyonu

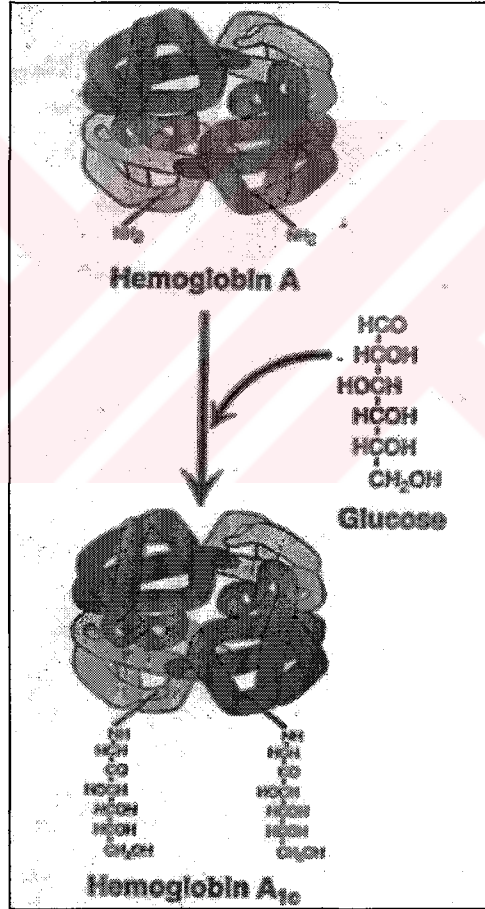
Hemoglobin gibi kısa ömürlü proteinlerde reaksiyon ketoamin düzeyinde kalır. Ancak elastin ve kollajen gibi uzun ömürlü proteinler de oluşan ketoaminin daha ileri glikasyona uğramasıyla tersinir olmayan, kalıcı glikoproteinler oluşur.

Yeni oluşan glikasyon ürünleri kan glukoz konsantrasyonu ile alakalı olarak bir dengeye ulaşır ve daha sonra biraz daha stabil olan erken glikasyon ürünleri gelişir. Bunun tipik örneği glükos hemoglobindir. Erken glikasyon ürünlerinin denge konumuna erişmesi haftalarca sürebilir. Glükos proteinler oto-oksidasyona uğrayabilirler ve bu esnada serbest radikal üretirler, sonuçta proteinlerin çapraz bağlanması ve degradasyonu ile diyabetin moleküler düzeydeki hasarının oluşumuna neden olurlar. Erken glikasyon ürünlerinin bazıları degradasyona uğrarken; kollajen, DNA veya diğer uzun ömürlü makromoleküllerdeki değişiklikten oluşan bazıları ise daha kompleks kimyasal reaksiyonlara girerler ve "ileri glikasyon son ürünleri" olarak tanımlanan daha stabil ve irreversible moleküllere dönüşürler. Oluşan değişmiş proteinler hücresel disfonksiyona ve diyabetin çeşitli komplikasyonlarına neden olurlar. Bu son ürünlerin in vitro olarak nitrikoksidi inaktive ettiklerinde bulunmuştur. (Bucala vd., 1991). İleri glikasyon son ürünlerini inhibe eden aminoguanidin kullanıldığında diyabetik sıçan aortalarında endotele bağımlı relaksasyonun düzeldiği gösterilmiştir. Aminoguanidin bir arginin analogudur ve nitrikoksit sentezini inhibe eder. İleri glikasyon son

ürünleri extraselüler matriks proteinleri üzerinde biriktiğinde, buraya monositlerin infiltrasyonuna neden olurlar. Bu olay diabetik ateroskleroza daha da hızlandırır.

2.6.1- Glikozillenmiş Hemoglobin

Her proteinin uğradığı non-enzimatik glikasyon gibi, bir metallo protein olan hemoglobinde glikasyona uğrar. Glikasyona uğramış hemoglobine HbA_{1c} adı verilir. HbA_{1c}'in HbA_{1a}, HbA_{1b} ve HbA_{1c} olmak üzere 3 tipi vardır. Teşhiste bunlardan HbA_{1c}'den yararlanır. Hemoglobinin glikasyonunda, içerdiği 4 zincirden β zicire glukoz bağlanması söz konusudur. Bağlanma β zincirinin terminal aminoasidi olan valine, yukarıda anlatıldığı gibi glukozun katılımıyla oluşur. Normal insanlarda HbA_{1c} düzeyi, o kimsenin hemoglobin düzeyinin %4-7 'si arasında değişir. Diabetli kimselerde diabetin ağırlığıyla orantılı olarak 2-3 katına çıkar.



Şekil2.9 Hemoglobinin non-enzimatik glikozillenmesi

Diabetli hastalarda bir defalık açlık kan şekeri bakmak, ya da açlık tokluk durumlarında kan şekeri düzeyini belirlemek çok kere yeterli bir bilgi vermemektedir. Bu yüzden , nispeten kısa sayılacak bir ömre sahip olan (120 güne kadar) eritrositlerin içerdiği hemoglobinin glikasyon

durumunu incelemekle bir hastanın yaklaşık üç aylık süre içindeki tüm kan glukoz düzeylerinin ortalaması hakkında oldukça sağlam bir bilgi elde etmek mümkündür.

Metabolik kontrol zayıflığı, diabetde retinopati ve nefropati gibi diabetik komplikasyonların riskini artırır. HbA_{1c}'nin kandaki ortalama glukoz seviyesini uzun süreler için göstermesi, diabetik hastalarda ortaya çıkabilecek diabetik komplikasyon risklerini ortaya koymak için kullanılabilir (The Diabetes Control and Complicatio Trial Research Group, 1993; UKPDS group, 1998).

Rutin klinik kullanımda testin 3-4 ayda bir yapılması yeterlidir. Gebelik diabeti veya tedavi sonucu oluşan major değişiklikler durumunda ise HbA_{1c}'nin 2-4 haftalık periyotlarda ölçülmesi uygundur (Goldstein vd., 1986).

2.7- Diabetde Serbest Radikal Oluşumu

Son yıllarda birçok patolojide olduğu gibi diabetin komplikasyonlarının patogeneğinde de serbest oksijen radikallerine ilgi artmıştır. Çünkü serbest oksijen radikallerinin nitrik oksit yıkımını arttırdığı bilinmektedir. Diabette de serbest radikal oluşumunun arttığı veya radikal bağlayıcı sistemlerde azalma olduğu belirlenmiştir.

Diabetik sıçanlar serbest radikal üreten bir sistemle karşı karşıya geldiklerinde endotelden kaynaklanan relaksasyondaki inhibisyon bu grupta kontrollere oranla daha belirgindir ve bu sıçanlarda süperoksit dismutaz ile serbest radikallerin uzaklaştırılması endotelden kaynaklanan vasodilatasyonda artışa neden olmaktadır (Tsfamariam ve Cohen, 1992). Benzer şekilde yüksek glukozla oluşan endotelden kaynaklanan relaksasyon bozukluğu süperoksit dismutaz varlığında düzelmektedir (Hattori vd., 1991). Süperoksit anyonu etkisini hidroksil iyon etkisi üzerinden göstermektedir ve bu da lipid peroksidasyonunun bilinen bir yoludur. Gerçekten de lipidle eriyebilen antioksidan bir madde olan probukolle tedavi edilen tavşanların aortalarında yüksek glukozun olumsuz etkilerinin olmadığı saptanmıştır (Tsfamariam ve Cohen, 1992).

2.7.1- Nitrik Oksit ve Diabet İlişkisi

Serbest radikallerin etkisiyle oluşan β -hücre hasarı IDDM (insüline bağımlı diabetes mellitus)'ye neden olur. Diabetin başlamasında oksidasyonun rol oynadığına dair bulguların çoğu, deney hayvanlarında diabetin oluşturan iki ilaç olan alloksan ve streptozotosin ile yapılan çalışmalarda elde edilmiştir. Bu kimyasal maddelerden ikiside oksidan madde

meydana getirerek langerhans adacıklarını sellektif olarak tahrip ederler. STZ'nin uygun olmayan NO cevapları meydana getirerek diabete neden olduğu düşünülmektedir (Godin vd.,1988; Wolf, 1993). Düşük doz STZ ile meydana getirilmiş deneysel insulitis sırasında adacıkları infiltre eden ilk inflamatuvar hücreler makrofajlardır. Aktive makrofajlar sitotoksik serbest radikaller üretirler. Özellikle hidroksil radikalleri β -hücrelerine karşı sitotoksiktir. İnvitro deneylerinde dihidrolipoik asit belirgin şekilde makrofajların neden olduğu adacık hücre yıkımını inhibe ederken, bu antioksidan yokluğunda uygunsuz NO cevabının neden olduğu adacık hücre yıkımının arttığı gösterilmiştir (Packer, 1993).

2.8- Antioksidanların Diabetteki Önemi

Serbest radikallerin hem diabet gelişimi (Oberley, 1988) hemde sonraki komplikasyonlarına (Wollf, 1993) katıldığı düşünülmektedir. Özellikle lipid peroksidasyonunun diabetik hastalarda artmış olduğu bildirilmektedir (Jennings and Jones,1987; Mooradian, 1991).

Dahası hem deney hayvanı (L Abbe and Trick,1994; Roza vd.,1995) hem de insan (Salonen vd., 1995) çalışmalarında elde edilen kanıtlar antioksidan savunmaların, diabet gelişiminden önce tehlikeye girdiğini düşündürmektedir. İnsanlarda yapılan çalışmaların çoğu, kanda bulunan nonenzimatik antioksidanlara yönelmişlerdir. Bu da aslında kan örneklerinin (doku örneklerine oranla) hastalardan alınmalarının daha kolay olmasına bağlanır. Bu çalışmalarda E vitamini üzerine fazlaca ilgi gösterilmiştir. Bazı araştırmacılar E vitamini konsantrasyonunun azaldığını (Hattori vd., 1991) bildirirken bazılarında arttığını (Krempf vd., 1991) bildirmişlerdir.

Buna karşılık C vitamininin, diabetik vakalarda düşük seviyelerde olduğuna dair bir anlaşmaya varılmıştır (Som vd., 1981; Jennings vd.,1987; Sinclair vd., 1991). Dahası C vitamini yetersizliğinin büyüklüğü hastalığın statüsüne bağlanmıştır (Sinclair vd., 1991). Mikroanjiopatili hastalar düşük C vitamini statüsüne sahiptirler.

Son yapılan çalışmalar da , diabette C vitamini tüketiminin hastalık oluşmasından sonra arttığının düşüncesi hakim olup (L Abbe ve Trick, 1994), diabetik hastaların normal C vitamini seviyesini muhafaza etmek için daha fazla C vitamini alımlarına ihtiyaç duydukları işaret edilmektedir.

2.8.1 - E Vitamini

E vitamini terimi dördü tokoferol (alfa, beta, gama,delta), dördü tokotrienol olmak üzere sekiz adet antioksidanı tanımlamak için kullanılır. Bu formlardan sadece alfatokoferol insan vücudunda kanda ve dokularda yüksek miktarlarda bulunur.

Alfatokoferol:

Alfatokoferolün insan vücudundaki ana fonksiyonu anti-oksidan oluşudur. İnsan vücudunda serbest radikaller, metabolizma faaliyetleri sonucu oluştuğu gibi, sigara, çevre kirliliği, gibi dış etkenler sonucu da oluşmaktadır. Hücre membranlarının bir parçası olan yağlar, serbest radikallerin sebep olduğu oksidasyona karşı savunmasızdır. Yağda çözünen bir vitamin olan alfatokoferol serbest radikalleri etkisiz hale getiren ve lipid parçalanmasında meydana gelen zincir reaksiyonları engelleyen tek vitamindir. Alfatokoferol vücuttaki hücre membranlarının bütünlüğünü sağladığı gibi, düşük yoğunluklu lipo proteinleri (LDL) oksidasyona karşı korur. Lipoproteinler yağ ve proteinden oluşan parçacıklardır ve yağların vücutta taşınmasını sağlar. LDL kolestrolü damarlardan dokulara taşır, okside LDL kardiyovasküler hastalıklara neden olur.

Alfatokoferol bir serbest radikali nötralize ettiğinde antioksidan özelliğini kaybeder. Ancak C vitamini gibi diğer bazı antioksidanlar alfatokoferolün antioksidan özelliğini tekrar kazanmasını sağlamaktadır. Alfatokoferolün antioksidan özelliği dışında belirlenmiş bir çok fonksiyonu daha bulunmaktadır. Örneğin Alfatokoferol protein Kinaz-C nin aktivitesini inhibe eder. Bu da enflamatuar ve immün hücrelerin aktivite ve ekspresyonlarını etkiler. Ek olarak alfatokoferolün trombosit agregasyonunu inhibe ettiği ve vasodilatasyonu arttırdığı gösterilmiştir (Traber, 2001).

Gamma tokoferol:

Gamma tokoferolün insanlardaki işlevi belirlenememiştir. Amerikan tarzı beslenmede E vitamininin en çok bu formda bulunmasına rağmen kandaki gamatokoferol seviyesi alfatokoferol seviyesinden 10 kat daha düşüktür.

E vitamini gereksinimi yakın zamana kadar erkeklerde 10 mg/gün, kadınlarda 8 mg/gün olarak tavsiye edilmekteydi. Ancak 2000 yılında Tıp Enstitüsü Gıda ve Beslenme krulu tarafından revize edilmiş olup, revize değerlere aşağıdaki tabloda yer verilmiştir.

Çizelge 2.3 Günlük E vitamini gereksinimi

GÜNLÜK E VİTAMİNİ GEREKSİNİMİ			
Yaşam evresi	Yaş	Erkeklerde mg/gün IU/gün	Kadınlarda mg/gün IU/gün
Bebeklerde	0-6 aylık	4 mg (6 IU)	4 mg (6 IU)
Bebeklerde	7-12 aylık	5 mg (7.5 IU)	5 mg (7.5 IU)
Çocuklarda	1-3 yaş	6 mg (9 IU)	6 mg (9 IU)
Çocuklarda	4-8 yaş	7 mg (10.75 IU)	7 mg (10.75 IU)
Çocuklarda	9-13 yaş	11 mg (16.5 IU)	11 mg (16.5 IU)
Ergenlik çağındakilerde	14-18 yaş	15 mg (22.5 IU)	15 mg (22.5 IU)
Yetişkinlerde	19 yaş ve üzeri	15 mg (22.5 IU)	15 mg (22.5 IU)
Hamilelerde	Bütün yaşlarda		15 mg (22.5 IU)
Emziren Kadınlarda	Bütün yaşlarda		19 mg (28.5 IU)

2.8.1.1- Antioksidan Olarak E Vitamininin Hastalıkların Önlenmesi ve Tedavisindeki Rolü

- Kardiyovasküler hastalıklar (kalp krizi ve kalp hastalıkları)

Yapılan geniş çaplı gözlemsel çalışmaların en az 5 tanesi yüksek e vitamini tüketiminin kadınlarda ve erkeklerde kalp krizi ve kalp krizi sonucu ölüm riskini azalttığını göstermiştir. Bu çalışmalardan 2 tanesi günde 7 mg alfa tokoferol alan hastaların günde 3-5 mg dan az alfatokoferol alan hastalardan %35 oranında daha az kalp krizi riski taşıdığını göstermiştir (Knekt vd., 1994; Kushi vd., 1996).

Yine yapılan gözlemsel çalışmalar, alfatokoferol takviyesinin kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde etkin olabileceğini konusunda görüşler ortaya koymaktadır. Örnek olarak, öncesinde koroner arter bypass ameliyatı geçirmiş bir kişi üzerinde yapılan gözlemlerde, kişinin günlük 100 IU alfatokoferol (67 mg RRR-alfa tokoferol) alması durumunda koroner ateroskleroz gelişiminin azaldığı anjiyografi ile ortaya konmuştur (Azen vd., 1996). Ayrıca Büyük Britanyada kalp hastalarına, yaklaşık 18 ay boyunca günlük 400-800 IU sentetik alfatokoferol verilerek yapılan bir çalışmada ölümcül olmayan kalp krizlerinde %77 gibi ciddi bir oranda azalma olduğu görülmüştür (Klein vd., 2001). Buna karşın kalp hastalıkları sebebi ile ölümlerde belirgin bir azalma görülememiştir. Kronik renal dializ hastalarının kardiyovasküler kalp hastalıkları sonucu ölüm riskine normal insanlara göre daha fazla açık

olduğu ve ayrıca yüksek oksidatif baskı altında oldukları bilinmektedir. Bu hastaların ortalama 1,4 yıllık süre ile 800 IU doğal alfatokoferol ile desteklenmeleri durumunda kalp krizi riskinde önemli azalmalar görülmüştür. Bununla birlikte 3 diğer test de ise alfatokoferol desteği ile risklerde belirgin bir azalma olacağı gösterilememiştir (Boaz, 2000).

- Katarakt

Katarakt göz lensinde bulunan proteinlerin oksidasyonu sonucu oluşmakta olduğundan, alfa tokoferol gibi antioksidanlar tarafından engellenebileceği düşünülmektedir. E vitamini tüketimi ile katarakt vakalarının ortaya çıkışı ve ciddiyetini araştırmak üzere 10 tane gözlemsel çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalardan 5 tanesinde e vitamini ile katarakt önlenmesi ile ilişkili herhangi bir ilişki bulunamadığı raporlanmıştır. 4629 kadın ve erkekte yapılan güncel bir çalışmada, deneklere uzun bir periyotta günlük 500 mg c vitamini, 400 IU e vitamini, 15 mg beta karoten verilmiş, ancak 7 yıllık bir süre içerisinde yaşlılıkla ilgili katarakt gelişiminin değiştiği ile ilgili herhangi bir sonuca ulaşılamamıştır.

- Bağışıklık Fonksiyonları

Birkaç ay boyunca günlük 200 mg sentetik alfa tokoferol (100 mg RRR alfatokoferol'a eşdeğer) alan yetişkinlerde Hepatit B ve Tetanos aşısı ardından vücutta antikor oluşumunun arttığı gözlemlenmiştir.

- Kanser

Kanserin bir çok türü DNA yapısının vücuttaki serbest radikaller tarafından zarara uğratılması sonucu oluşmaktadır. Alfatokoferolun serbest radikalleri nötralize etme yeteneği nedeni ile, kanserin önlenmesinde alfatokoferol kullanımı üzerine bir çok araştırma yapılmıştır. Ancak bir çok araştırmada akciğer ve göğüs kanseri ile alfatokoferol alımı arasında belirgin ilişkiler kurulamamıştır. Ancak sigara içen kişilerde akciğer kanserinin önlenmesi amacıyla günlük 50 mg sentetik alfatokoferol ile desteklenen deneklerin takibi sırasında bu deneklerdeki prostat kanseri oluşumunda %34 azalma olduğu bulunmuştur. Ancak deney sonuçlarının raslantısal olabilmesi ihtimali nedeniyle, alfatokoferol ile prostat kanseri arasındaki ilişki detaylı olarak araştırılmalıdır.

Hayvanlar üzerinde alfatokoferal enjeksiyonu yöntemi ile yapılan çalışmalar tümör gelişiminin inhibe edildiğini göstermektedir (Weber vd.,2002; Malafa ve Neitzel, 2000). Ancak insanlardaki kanser terapisinde alfatokoferol suksinatın faydalı olup olmadığının belirlenebilmesi için yapılan çalışmaların genişletilmesine ihtiyaç vardır.

- Diabetes Mellitus

Bu hastalardaki oksidatif baskının yüksek olması ve diabetik hastaların ölüm nedenleri arasında kalp krizi ve kalp hasatlıklarının önemli bir yer tutması diabetikler üzerindeki alfatokoferol takviyesinin gerekliliğini gösterir. Güncel bir çalışmada, diabetik hastalarda oluşabilecek oksidatif baskının işaretçisi olarak biyokimyasal bir işaretçi kullanmıştır. 14 gün boyunca günlük 600 mg sentetik alfatokoferol (300 mg RRR-tokoferol) verilen hastalarda oksidatif işaretçi miktarında azalma görülmüştür. Alfatokoferol takviyesinin kandaki glikoz kontrolü üzerindeki etkisine yönelik çalışmalar tutarsızlık göstermektedir. Bir çalışma günlük sadece 100 IU seviyesindeki sentetik alfatokoferol takviyesinin kandaki glikoz seviyesinin kontrolünü arttırdığını söylemesine rağmen (Jain vd., 1996), 900– 1600 IU sentetik alfatokoferol kullanılan çalışmalar, ya çok az düzenleyici etki göstermiş yada hiç etki göstermemiştir (Poalisso vd., 1993; Reaven vd., 1995). Ancak bu konudaki çalışmaların az olması alfatokoferolün diabetiklerde faydalı olacağı yönündeki inançların devamı için yeterlidir.

2.8.1.2- E Vitamini Yetersizliği

E vitamini eksikliği yetersiz beslenme, alfatokoferol taşıyıcı proteinlerin genetik olarak işlev görmemesi, ve yağ emilimi bozukluğu sendromu gibi birçok sebepten oluşabilmektedir.

Cystic fibrosis veya kalestetik damar hastalığı olan çocuklarda, beslenme ile E vitamini absorpsiyonu kapasitesinin zayıf olmasından dolayı semptomatik E vitamini yetersizliği görülmektedir.

Ciddi ölçülerdeki e vitamini eksikliği, denge bozukluğu, gözde retina hasarı, ataksia, periferel neropati, miyopati, kas güçsüzlüğü gibi rahatsızlıklara sebep olabilmektedir (Traber, 1999).

Bu nedenle, periferel neropati, ataksia, veya retinitisi pigmentosa görülen hastalarda e vitamini eksikliği olup olmadığı araştırılmalıdır. Gelişme evresinde olan sinir sistemleri e vitamini eksikliğine karşı özellikle hassastır. Doğuştan E vitamini eksikliği olan cocuklarda nörolojik semptomlar hızlı biçimde gelişmektedir (Sokol, 1996).

3- DENEYSEL KISIM

3.1 Kullanılan Cihazlar, Eşyalar ve Kimyasal Maddeler

3.1.1 Kullanılan Cihazlar ve Eşyalar

- Shimadzu UV-2401 PC UV- Visible Recording Spektrofotometre
- Tekniklab marka Santrifüj
- Backman marka pH metre
- Mettler Toledo AT 201 Terazi
- İnsülin enjektörü
- Klempler
- Çeşitli cam eşyalar

3.1.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Amino 4- Antipirin (Sigma)

Fenol (Sigma)

Glukoz Oksidaz (Randox)

Glukoz (Sigma)

STZ (Sigma)

Heparin(Sigma)

Glukozillenmiş Hemoglobin “HbA_{1c} II” Kiti (Roche)

Boehringer Mannheim “NO Colorimetric Assay Kiti” (Sigma)

Vitamin E (Sigma)

Sodyum azid (Sigma)

Sodyum Klorür (Merck)

3.2- DeneYler Öncesi DeneY Hayvanlarına Yapılan İşlemler

İ.Ü Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, deneY hayvanları üretim labaratuvarından temin edilen 18 ad Wistar Albino cinsi erkek sıçana kuyruk kanatma yöntemiyle, glukoz tayini yapıldı. Diabetik olmayan tüm sıçanlar, deneY için kafeslere bölündü. 5 sıçan bir kafesde kontrol için, 7 sıçan diabetik grubu oluşturmak üzere 2 kafese, 6 sıçan diabetik+ vitamin E grubunu oluşturmak üzere 2 ayrı kafese bölündü. Sıçanlara STZ enjeksiyonuna kadar serbest beslenme ve su uygulandı.

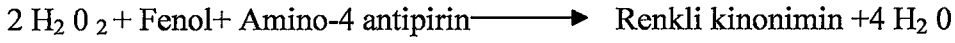
3.2.1 Sıçanların Diabetik Yapılması İşlemi

1. gruba kontrol grubu olarak intraperitoneal serum fizyolojik enjeksiyonu, 2 ve 3. Gruba streptozotosin (STZ) enjeksiyonu (STZ 65 mg/kg) uygulandı. DeneY gruplarında diabetik oluşumu, 48 saat içinde kuyruk kanından glukoz miktarı strip yöntemiyle tayin edildi. DeneY gruplarının 2.sine 48 saat sonra 2.2 mg/ kg gün E vitamini (yağda çözülmüş alfa tokoferol, sigma) intraperitoneal 2 hafta süreyle uygulandı. 1. Grup, diabetik olmayan kontrol grubu olup, 2. Grupla beraber serum fizyolojik stress enjeksiyonuna hergün maruz bırakılıp, diğer grubun enjeksiyon stresinin eşi yaşatıldı. DeneY hayvanları serbest beslenme ve su tüketimi uygulanacak şekilde 2 hafta süreyle kafes bakımı yapıldı. Süre sonunda, sodyumpentobarbital enjeksiyonu ile uyutulan sıçanların her iki karotis arteri 10 dakika klampe edilerek serebral iskemi oluşturuldu, bunu takip eden 1 saat kan akışı tekrar sağlanarak, reperfüzyon oluşturuldu. Süre sonunda toraks açıldıktan sonra sağ ventrükülden heparinize kan numuneleri alındı. Uygun santrifüj işlemleri ile numuneler tayinlere hazır hale getirildi.

3.3 Kan Şekeri Tayini

1000 µl glukoz oksidaz enzimi + 10 µl plazma ve 1000 µl glukoz oksidaz enzimi+ %100 glukoz çözeltisi karıştırılıp, 37 °C' de 10 dakika inkübe edilir, Blank tüpe karşı 500nm'de absorbansları okunur.

Glukoz oksidaz



	Test (µl)	Standart(µl)	Blank(µl)
Plazma	10	-	-
Standart (%100 mg)	-	10	-
Reaktif	1000	1000	1000

Hesaplama:

% mg glukoz = $A_{\text{örnek}} / A_{\text{std}} \times 100$ eşitliği kullanılarak hesaplanır.

3.4 Glukozillenmiş Hemoglobin (HbA_{1c}) Tayini

Alınan 10 µl kan üzerine, 1000 µl hemoliz reaktifi eklenip, karıştırılır. Daha sonra üzerine sırasıyla, 20 µl R1 ve 20 µl R2 reaktifleri ilave edilir. Oluşan kompleks türbidimetrik olarak okunur. Standartlar da aynı yöntemle okunduktan sonra HbA_{1c} miktarı hesaplanır. Kandaki HbA_{1c}'nin normal değeri % 4-6 kadardır.

Roche "HbA_{1c} II" kiti kullanılmıştır. Kitin Muhteviyatı;

Hemoliz reaktifi: TTAB: 9g/ l; stabilizör

R1 : MES tanponu : 0.025 mol/l, TRIS tanponu : 0.015 mol/l, pH : 6.2

HbA_{1c} antikoru: ≥ 0.5 mg/ml ; stabilizör.

R2 : MES tanponu : 0.025 mol/l, TRIS tanponu : 0.015 mol/l, pH : 6.2

HbA_{1c} polihapten: ≥ 8 µg/ml ; stabilizör.

*MES: 2-morpolinoetan sulfonik asid

*TRIS: Tris(hidroksimetil)- aminometan

*TTAB: Tetradecyltrimetilamonyumbromat

Hemoglobin Tayini

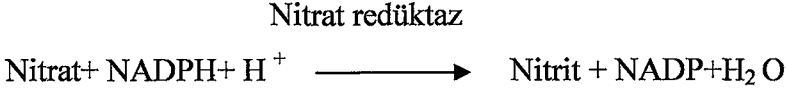
50 µl homolizat 12 ml fosfat tanponu ve sodyum azid (pH : 6.4) ile karıştırılıp 415 nm' de distile suya karşı absorbansı okunur. Burdan total hemoglobin miktarı hesaplanır.

Hesaplama:

% Glikozillenmiş hemoglobin = HbA_{1c} konsantrasyonu/ Total hemoglobin x 100 eşitliği ile hesaplanır.

3.5 Nitrit/ Nitrat Tayini

Nitrat, nitrat redüktaz enzimi ve NADPH varlığında nitrite indirgenir.



Nitritin sülfonilamid ve N-1- naftil etilendiamin dihidroklorid ile reaksiyona girmesi sonucu kırmızı-mor renkli diazo bileşiği oluşur.

Oluşan diazo bileşiği 540 nm dalga boyunda okunur. Bu işlemle total nitrit ve nitrat tayin edilmiş olunur. Ayrıca nitrat redüktaz reaksiyonunu oluşturmadan plazma nitrit düzeyi direkt reaksiyonel oluşan renkli diazo bileşiğinin yine 540 nm'de köre karşı spektrofotometrik değerlendirilmesinden hesaplanır.

Boehringer Mannheim "Nitric Oxide Colorimetric Assay" kiti kullanılmıştır.

	Kör nitrit (μl)	Örnek nitrit (μl)	Kör nitrit+nitrat (μl)	Örnek nitrit+nitrat (μl)
Örnek	-	500	-	500
Distile su	770	270	500	-
Reaksiyon Karışımı 2	-	-	250	250
Çözelti 3	-	-	20	20
Oda ısısında 30 dakika beklenir ve süre sonunda A_1 okuması yapılır.				
Renk reaktifi 1	250	250	250	250
Renk reaktifi 2	250	250	250	250
Karanlıkta 15 dakika bekletilip, süre sonunda A_2 okuması yapılır.				

Hesaplama:

$$\Delta A_{\text{nitrit}} = (A_2 - A_1)_{\text{nitrit}} - (A_2 - A_1)_{\text{kör nitrit}}$$

$$\Delta A_{\text{nitrit+nitrat}} = (A_2 - A_1)_{\text{nitrit+nitrat}} - (A_2 - A_1)_{\text{kör nitrit+nitrat}}$$

$$\Delta A_{\text{nitrat}} = (A_2 - A_1)_{\text{nitrit+nitrat}} - \Delta A_{\text{nitrit}}$$

Hesaplamalar standart eğrisi kullanılarak yapıldı.



4- DENEYSEL SONUÇLAR

Çizelge 2.4 Kontrol grubu, diabetik grup, diabetik + vitamin E gruplarının glukoz (% mg) değerleri.

	KONTROL GRUBU	DIABETİK GRUP	DIABETİK+VİTAMİN E GRUBU
GLUKOZ (% mg)	138	352.4	385
	164	375	339
	112	397.6	382.7
	156	347	341.3
	120	403	362

Çizelge 2.5 Kontrol grubu, diabetik grup, diabetik + vitamin E gruplarının HbA_{1c} (%) değerleri.

	KONTROL GRUBU	DIABETİK GRUBU	DIABETİK+VİTAMİN E GRUBU
HbA _{1c} (%)	4.13	7.58	7.54
	4.57	7.6	6.96
	4.38	7.86	7.25
	4.63	8.12	6.99
	4.19	8.14	7.51

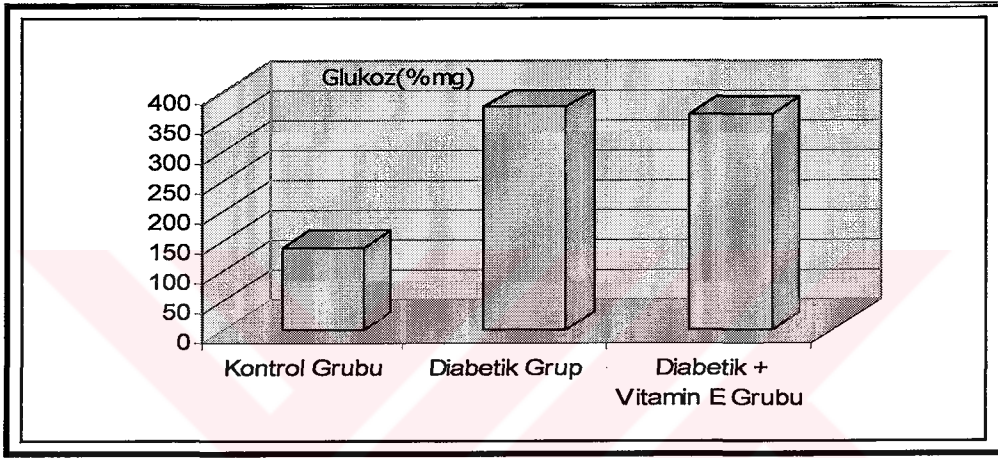
Çizelge 2.6 Kontrol grubu, diabetik grup, diabetik + vitamin E gruplarının total nitrit+nitrat (nmol/L) değerleri.

	KONTROL GRUBU	DIABETİK GRUP	DIABETİK+VİTAMİN E GRUBU
TOTAL NİTRİT+NİTRAT (nmol/L)	16.6	24.3	17.5
	16.2	25.7	17.9
	17.0	25.9	18.5
	17.3	25.1	18.3
	15.9	24.5	17.3

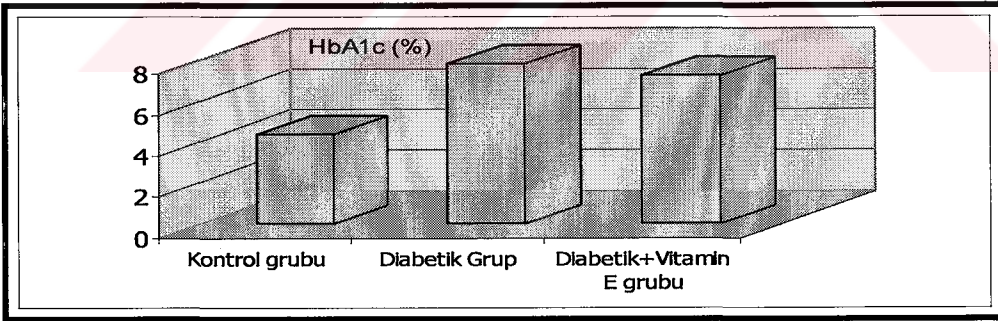
Çizelge 2.7 Kontrol grubu, diabetik grup, diabetik + vitamin E gruplarının ortalama glukoz (% mg), HbA_{1c} (%), total nitrit+nitrat, (nmol/L) değerleri.

	Kontrol Grubu (n=5)	Diabetik Grup (n=5)	Diabetik + Vitamin E Grubu (n=5)
Glukoz (% mg)	138+/- 0.26	375+/- 22.6	362+/- 20.7
HbA _{1c} (%)	4.38 +/- 0.19	7.86 +/- 0.28	7.25 +/- 0.26
Total Nitrit + Nitrat (nmol/L)	16.6 +/- 0.4	25.1 +/-0.8	17.9 +/- 0.6

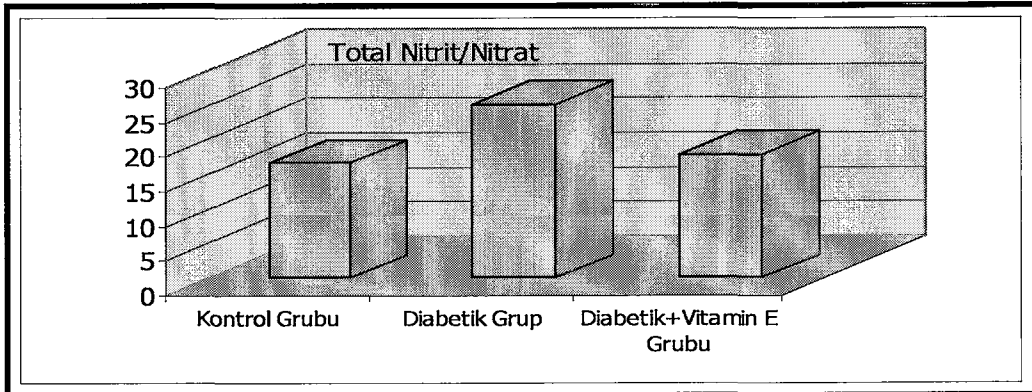
Çizelge 2.8 Ortalama glukoz (% mg) değerlerinin karşılaştırılması.



Çizelge 2.9 Ortalama HbA_{1c} (%) değerlerinin karşılaştırılması.



Çizelge 2.10 Ortalama total nitrit+nitrat (nmol/L) değerlerinin karşılaştırılması.



SONUÇLAR VE TARTIŞMALAR

Sıçanlarda STZ uygulanması sonucunda, plazmada tayin edilen glukoz ve HbA1c sonuçları kontrol grubuna karşı değerlendirildiğinde, deney gruplarında başarılı bir şekilde diabet oluşturulduğu görülmüştür. ($p < 0.001$). Diabetik yapılp, vitamin E uygulanan deney gruplarında ise, glukoz ve HbA1c sonuçları diğer diabetik grupla kıyaslandığında, sayısal olarak daha büyük değerler gözlenebile, istatistik olarak anlamlılık bulunamamıştır. ($p < 0.5$)

Buna karşın, STZ uygulanıp, E vitamini verilen ve iskemi reperfüzyon modeli oluşturulan deney grubu ile STZ uygulanıp iskemi reperfüzyon modeli oluşturulan diğer deney grubu total nitrit+nitrat düzeyleri bakımından kıyaslandığında vitamin E uygulanan deneysel grubun sonuçlarının ileri derecede anlamlı azalmış olduğu görülmüştür. ($p < 0.001$)

Bu sonuca göre deneysel diabet oluşturulup, beyin iskemi reperfüzyon hasarı modeli geliştirilen grup, kontrol grubu ile kıyaslandığında NO metabolizmasında NO artışına sebep olmuştur. Bu artışın, inhibitörler kullanılarak ileri derecedeki çalışmalarda, i-NOS'den kaynaklandığı büyük ölçüde gösterilmiştir. Oysaki Diabetik yapılp, iskemi reperfüzyon modeli oluşturulan gruba bir antioksidan olarak vitamin E uygulanmasının kontrol grubu ile kıyaslandığında NO oluşumunda anlamlı bir artışa sebep olmadığı gösterilmiştir. Muhtemelen antioksidan olarak vitamin E, i-NOS uyarılmasını bu deneysel modelde azaltmıştır.

Sıçanların STZ ile diabetik yapılması, kronik diabet sayabileceğimiz bu süreçte plazmada oksidan stres oluşumunun artışı muhtemeldir ve birçok çalışmada bu artış gösterilmiştir (Godin vd., 1988 ; Wolf, 1993) Bizim çalışmamızda muhtemelen diabetin getirdiği oksidatif stres ve oksijen radikal artışı, bir radikal olan NO'nun etkinliğini azalttığından, organizma bir telafi mekanizması olarak veya bazı izoenzimleri uyararak NO oluşumunu arttırmıştır. Oysaki vitamin E'nin bir antioksidan olarak plazmada oksijen radikali oluşumunu ve/veya oluşan oksijen radikallerinin tutulması yoluyla NO etkinliğini arttırdığından NO oluşumu kontrollere göre yüksek seviyelerde gözlenmiştir. ($p < 0.05$)

Sonuç olarak, diabetin getirdiği oksidatif stres NO metabolizmasını etkilemekte, özellikle de NO etkinliğini azalttığından NO üretimini indüklemektedir. Çalıştığımız deneysel modelde de bazı NO izoenzimlerinin indüklenmesi de söz konusudur. NO ve oksijen radikali (O_2^-) etkileşimi çok süratlidir ve vasküler sistem için toksik olan peroksinitirt oluşumuyla sonuçlanır. (Packer, 1993) Bundan dolayıdırki antioksidanlarla oksidatif stresin azaltılması diabetik komplikasyonların düzenlenmesinde ve NO oluşumunun sınırlandırılmasında yararlı olacağı aşikardır. Aksi takdirde sınırsız NO oluşumu organizmaya zararlı etkiler oluşturabilecektir.



KAYNAKLAR

- Anggard, E., (1994), "Nitric oxide Mediator, murderer and medicine", *Lancet*, 343:1199-206.
- Athar, M., Abdulla, H., Sultana, S., Favier, A. ve Pero, R., (1993), "Free radicals and trace elements", *The Journal of Trace Elements in Experimental Medicine*, 6: 65-73.
- Azen, S.P., Qian, D. ve Mack, W.J., (1996), "Effect of supplementary antioxidant vitamin intake on carotid arterial wall intima-media thickness in a controlled clinical trial of cholesterol lowering", *Circulation*, 94(10):2369-2372.
- Azuma, H., Obayashi, S., Hamasaki, H., Koyama, T. ve Aso, T., (1995), "Role of endothelium in the human uterine arteries during normal menstrual cycle", *Br J Pharm*, 114:902-8.
- Beckman, J.S., Beckman, T.W., Chen, J., Marshall, P.A. ve Freeman, B.A., (1990), "Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide", *Proc Natl Acad Sci USA*, 87:1620-4.
- Beckman, J.S., Carson, M., Smith, C.D. ve Koppenol, W.H., (1993), "SOD and peroxynitrite", *Nature*, 18:195-9.
- Bindokas, V.P., Jordan, J., Lee, C.C. ve Miller, R.J., (1996), "Superoxide production in rat hippocampal neurons: selective imaging with hydroethidine", *J Neurosci*, 16:1324-36.
- Bredt, D.S., Hwang, P.M. ve Synder, S., (1990), "Localization of nitric oxide synthase indicating neural role for nitric oxide", *Nature*, 347:768-770.
- Bredt, D.S. ve Snyder, S.H., (1992), "Nitric oxide A novel neuronal messenger", *Neuron*, 8:3-11.
- Bucala, R., Tracey, K.J., Cerrami, A., (1991), "Advanced glycosylation products quency nitric oxide and mediate defective endothelium-dependent vasodilation in experimental diabetes", *J Clin Invest*, 87:432-438.
- Busse, R., Fleming, I., (1996), "Endothelial dysfunction in atherosclerosis", *J Vasc Res*, 33:181-94.
- Boaz, M., Smetana, S. ve Weinstein, T., (2000), "Secondary prevention with antioxidants of cardiovascular disease in endstage renal disease: Randomised placebo-controlled trial." *Lancet*, 356(9237):1213-1218.
- Chan, P.H., (1996), "Role of oxidants in ischemic brain damage", *Stroke*, 27:1124-29.
- Collins, A.R., Dusinska, M., Gedik, C.M. ve Stetina, R., (1996), "Oxidative damage to DNA: do we have a reliable biomarker?", *Environ Health Perspect*, 3:465-9.
- Corbett, J.A., Mikhael, A., Shimizu, J., Frederick, K., Misko, T.P. ve McDaniel, M.L., (1993), "Nitric oxide production in islets from monobese diabetic mice: Aminoguanidine-sensitive and resistant stages in the immunological diabetic process.", *Proc Natl Acad Sci*, 90:8992-5.
- Darley-Usmar V., Hogg, N., Kalyanarman, B. ve Moore, K., (1993), "Free radicals in the vasculature: pathological and physiological significance. In: Rice-Evans CA, Bruckdorfer

KR. de Belder, A.J., Radomski, M.W., why HTF, et al. Nitric oxide synthase activities in human myocardium”, *Lancet*, 341:84-85, 1993.

Edwards, A.D., (1995), “The pharmacology of inhaled nitric oxide.”, *Arch Dis Child*, 72:127-30.

Esterbauer, H., Schaur, R.J. ve Zollner, H., (1997), “Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal in in situ perfused rat kidney.”, *J Lipid Res*, 38:1660-5.

Frei, B., (1999), “Molecular and biological mechanisms of antioxidant action”, *FASEB J*, 13:963-4

Frindovich, I., (1978), “The biology of oxygen radicals. The superoxide radical is an agent of oxygen toxicity: Superoxide Dismutase provide an important defences”, *Science*, 20,875-880.

Furchgott, R.F. ve Zawadski, J.V., (1980), “The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arteriolar smooth muscle by acetylcholine”., *Nature*, 288:373-376

Garthwaite, J., (1991), “Glutamate nitric oxide and cell-cell signaling in the nervous system.” *Trends in Neurosciences*, 14, 60-67.

Godin, D.V., Wohaiab, S.A., Garnett, M.E. ve Goumaniouk, A.D., (1988), “Antioxidant Enzyme Alterations in Experimental and Clinical Diabetes.”, *Mol and Biochem.*, 84:223-231.

Goldstein, D.E., Little, R.R., Wiedmeyer, H.M., England, J.D. ve McKenzie, B.M., (1986), “Glycated hemoglobin: methodologies and clinical applications.”, *Clin Chem.*, 32:B64-B70.

Goldstein, D.E., Little, R.R., Lorenz, R.A., Malone, J.I., Nathan, D. ve Peterson, C.M., (1995), “Test of glycemia in diabetes.”, *Diabetes Care.*, 18:896-909

Gutteridge, J.M., (1995), “Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage.”, *Clin Chem*, 41(12):1819-28.

Halliwell, B., (1999), “Establishing the significance and optimal intake of dietary antioxidants: the biomarker concept.”, *Nutr Rev*, 57:104-13.

Hartmann, A., Yatsu, F. ve Kuschinsky, W., (1994), “Cerebral ischemia and Basic Mechanisms, Berlin”, Springer-Verlag Press, Heidelberg, pp 405-10.

Hattori, Y., Kawasaki, H., Abe, K. ve Kanno, M., (1991), “Superoxide dismutase recovers altered endothelium dependent relaxation in diabetic rat aorta.”, *Am J Physiol*, 261:H1086-H1094.

Hue, R.T. ve Padmaja, S., (1993), “The reaction of NO with superoxide.”, *Free Radic Res Commun*, 18:1620-24.

Imaizumi, S., Kinouchi, H., Tominaga, T., Yoshimoto, T. ve Suzuki, J., (1987), “In: Suzuki J. Biochemical events in the ischemic brain and pharmacological basis of mannitol, vitamin E, glucocorticoid and phenitoin. In: Advances in surgery of cerebral stroke proceedings of the international symposium on surgery for cerebral stroke Sendai”, Springer-Verlag Press, pp. 257-63.

İşlekel, H., İşlekel, S., Güner, G. ve Özdamar, N., (1999) "Evaluation of lipid peroxidation cathepsin L and acid phosphatase activities in experimental brain ischemia-reperfusion." , Brain Res 843:18-24

İşlekel, S., İşlekel, H., Güner, G. ve Özdamar, N., (1999), "Alterations in superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase activities in experimental cerebral ischemia-reperfusion", Res Exp Med, (3):167-76.

Jain, S.K., McVie, R., Jaramillo, J.J., Palmer, M. ve Smith, T., (1996), "Effect of modest vitamin E supplementation on blood glycated hemoglobin and triglyceride levels and red cell indices in type I diabetic patients.", J Am Coll Nutr., 15(5):458-461.

Janssens, S.P., Shimouchi, A., Quertermous, T., Block, D.B. ve Black, K.D., (1992), "Cloning and expression of a cDNA encoding human endothelium- derived relaxing factor/ nitric oxide synthase.", J Biol Chem, 267, 14519-14522.

Jennings, P.E., Chiraco, S. ve Jones, A.F., (1987), "Vitamin C metabolites and microangiopathy in diabetes mellitus", Diabet Res 6: 151-154.

Kausic, Z.S. ve Cosentino, F., (1994), "Nitric oxide synthase from molecular biology to cerebrovascular physiology.", New in Physiological Sciences, 9:64-67.

Kayaalp, S.O., (1990), "Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji. Cilt 3.", Ankara: Feryal Matbaası.

Kilgore, K.S. ve Lucchesi, B.R., (1995) "Free radicals and the inflammatory response. In: Rice-Evans CA, Bruckdorfer KR. Oxidative stress, lipoproteins and cardiovascular dysfunction", London, Portland Press,161-80.

Kilgore, K.S. ve Lucchesi, B.R., (1993), "Reperfusion injury after myocardial infarction: The role of free radicals and the inflammatory response.", Clin Biochem, 26:359-70.

Kinsella, J.P. ve Abman, S.H., (1993), "Methaemoglobin during nitric oxide therapy with high frequency ventilation.", Lancet, 342:615.

Kirk, S.J., Regan, M.C. ve Barbul, A., (1990), "Cloned murine T lenphocytes synthease a molecule with the biological charecteristics of nitric oxide.", Biochem. Biopsy. Res. Colulun., 173:660-665.

Kitagawa, K., Matsumoto, M., Oda, T., Nnobe, M. ve Hata, R., (1990), "Free radical generation during brief period of cerebral ischemia may trigger delayed neuronol death.", Neuroscience, 35 (3):551-8.

Klein, E.A., Thompson, I.M. ve Lippman, S.M., (2001), "The next prostate cancer prevention trial. Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial.", J Urol., 166(4):1311-1315.

Knekt, P., Reunanen, A., Jarvinen, R., Seppanen, R., Heliovaara, M. ve Aromaa, A., (1994), "Antioxidant vitamin intake and coronary mortality in a longitudinal population study". , Am J Epidemiol., 139(12):1180-1189.

Knowles, R.G. ve Moncado, S., (1992), "Nitric oxide as a signal in blood vessels.", Trends Biochem Sci, 17:399-402.

Krause, G.S, Joyce, K.M, Nayini, R.N, Zonia, C.L. ve Garritano, A.M., (1985), "Cardiac arrest and resuscitation: Brain iron delocalization during reperfusion.", *Ann Emerg Med.*, 14:1037-43.

Krempf, M., Ranganathan, S. ve Rotz, P., (1991), "Plasma vitamin A and E in type 1 and type 2 adult diabetic patients.", *Int.J Vitamin Nutr., Res* 61:38-42.

Kuo, P.C. ve Schroeder, R.A., (1995), "The emerging multifaceted roles of nitric oxide.", *Ann. Surgery*, 22:220-235.

Kushi, L.H., Folsom, AR, Prineas, R.J, Mink, P.J., Wu, Y. ve Bostick, R.M., (1996), "Dietary antioxidant vitamins and death from coronary heart disease in postmenopausal women", *N Engl J Med.*, 334(18):1156-1162.

L.Abbe, M.R. ve Trick, K.D., (1994), "Changes in pancreatic glutathione peroxidase and superoxide dismutase activities in the prediabetic diabetes-prone BB rat.", *Proc Soc Exp Biol Med* 207-206-212.

Lida, S., Ohshima, H., Opuchi, S., Suzuki, H., Kawasaki, H. ve Esumi, H., (1992), "Identification of inducible calmodulin-dependent nitric oxide synthase in the liver of rats.", *J Biol Chem*, 267, 25385-25388.

Lipton, S.A., Choi, Y.B., Pan, Z.H., Lei, S.Z., Chen, H.S., Sucher, N.J., Loscalzo, J., Singel, D.J. ve Stamler, J.S., (1993), "A redox based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds". *Nature*, 364:626-32.

Lorenzi, M. ve Caliero, E., (1991), "Pathobiology of endothelial and other vascular cells in diabetes mellitus", *Diabetes.*, 40, 653-659.

Malafa, M.P. ve Neitzel, L.T., (2000), "Vitamin E succinate promotes breast cancer tumor dormancy.", *J Surg Res.*, 93(1):163-170.

Marletta, M.A., Yoon, P.S., Iyengar, R., Leaf, C.D. ve Wishnig J.S., (1988), "Macrophage oxidation of L arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate.", *Biochemistry*, 27, 8708711.

Masaki, K.H., Losonczy, K.G. ve Izmirlian, G., (1992) "Association of vitamin E and C supplement use with cognitive function and dementia in elderly men.", *Neurology*, 54(6):1265-1272.

Mayer, B., John, M., Heinzl, B., Werner, E.R., Wachter, H., Schultz, G. ve Bohme, E., (1991), "Brain nitric oxide synthase is a biopterin and flavin containing multifunctional oxidoreductase.", *Fer Eur Biol Soc* 288,187-191.

McCord, J.M., (1993) "Human disease, free radicals, and the oxidant/antioxidant balance", *Clin Biochem*, 26:351-7.

Moncada, S., Palmer, R.M.J. ve Higgs, A., (1991), "Nitric oxide physiology, pathophysiology, and pharmacology.", *Pharmacol Rew*, 43,119-142,

Moncada, S., (1992), "The L- arginine nitric oxide pathway", *Acta Physiol Scand.*, 145:201-207.

Moncada, S. ve Higgs, A., (1993), "The L-arginine-nitric oxide pathway". *New Eng Med*, 329:2002-12.

Mooradian, A.D., (1991), "Increased serum conjugated dienes in elderly diabetic patients", *J Am Ger Soc*, 39: 571-574.

Neuzil, J., Weber, T. ve Schroder, A., (2001), "Induction of cancer cell apoptosis by alpha-tocopheryl succinate: molecular pathways and structural requirements.", *FASEB J.*,15(2):403-415.

Oberley, L.W., (1988), "Free radicals and diabetes", *Free Radic Biol Med* 5: 113-24.

Okada, Y., Copeland, B.R., Fitridge, R., Koziol, J.A. ve Zoppo, D.G.J., (1994), "Fibrin contributes to microvascular obstructions and parenchymal changes during early focal cerebral ischemia and reperfusion", *Stroke*, 25:1847-54.

Packer, L., (1993), "The role of Anti-Oxidative Treatment in Diabetes Mellitus", *Diabetologia*, 36: 1212-1213.

Palmer, R.M.J., Ashton, D.S. ve Moncado, S., (1998), "Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L.arginine" *Nature* 333:664-666.

Palmer, R.M.J., Ferrige, A.G. ve Moncado, S., (1987), "Nitric oxide release accounts for biological activity of endothelium-derived relaxing factor", *Nature*, 327:524-526.

Paolisso, G., D'Amore, A. ve Galzerano, D., (1993), "Daily vitamin E supplements improve metabolic control but not insulin secretion in elderly type II diabetic patients." *Diabetes Care*, 16(11):1433-1437.

Patel, R.K., McAndrew, J., Sellak, H., White, C.R., Jo, H., Freeman, B.A. ve Darley-Usmar, (1999), "Biological aspects of reactive nitrogen series", *Biochym Biophys Acta*, 1411:385-400.

Pedersen, J.Z. ve Finazzi-Agro, A., (1993), "Protein - radical enzymes", *FEBS Letters*, 325 (1,2): 53-58.

Petros, A., Benett, D. ve Vallance, P., (1991), "Effect of nitric oxide synthase inhibitors on hypotension in patients with septic shock", *Lancet*, 338:1557-8.

Pouslov, W.S., Brecht, D.S., Synder, S.H. ve Rosen, G.M., (1992), "Generation of superoxide by purified brain nitric oxide synthase", *J.Biol Chem*, 267, 24173-24176.

Reaven, P.D., Herold, D.A., Barnett, J. ve Edelman, S., (1995), "Effects of Vitamin E on susceptibility of low-density lipoprotein and low-density lipoprotein subfractions to oxidation and on protein glycation in NIDDM.", *Diabetes Care.*, 18(6):807-816.

Rohlfing, C.L., Wiedmeyer, H.M., England, J.D., Tennil, A. ve Goldstein, D.E., (2002), "Defining the relationship between plasma glukose and HbA1c", *Diabetes Care*, 25,275-278.

Rosa, A.M. ve Pieper, G.M., (1995), "Pancreatic antioxidant enzyme activity in normoglycemic diabetes prone BB rats", *Pancreas*, 10:53-58.

Salonen, J.T., Nyyssonen, K. ve Tuomainen, T.P., (1995), "Increased risk of non-insulin dependent diabetes mellitus at low plasma vitamin E concentrations: A four year study in man.", *Br Med J.*, 311:1124-1127.

Schmidt, K., Klatt, P., Majer, P., (1994), "Reaction of peroxynitrite with oxyhaemoglobin" interference with photometrical determination of nitric oxide.", *Biochem.J.*, 301:645-647.

Schulz, R., Nava. E. ve Moncado, S., (1992), "Induction and potential biological relevance of Ca²⁺-independent nitric oxide synthase in the myocardium", *Br J Pharmacol*, 105:575-580.

Siesjo, B.K., Katsura, K.I., Zhao, Q., Folbergrova, J. ve Pahlmark, K., (1995), "Mechanisms of secondary brain damage in global and focal ischemia a speculative synthesis", *J Neurotrauma*, 12 (5): 943-56.

Sinclair, A.J., Girling, A.S. ve Gray, L., (1991), "Disturbed handling of ascorbic acid levels in patients with and with out microangiopathy during high dose ascorbate supplementation", *Diabetologia*, 34:171-175

Sinclair, A.J., Taylor, P.B. ve Lunec, J., (1994), "Low plasma ascorbic acid levels in patients with type 2 diabetes mellitus consuming adequate dietary vitamin C", *Diabet Med*, 11:893-898.

Sokol, R., "Vitamin E.", In: Ziegler EE, Filer LJ, eds. *Present Knowledge in Nutrition*. 7th ed: ILSI Press, 130-136.

Som, S., Basu, S. ve Mukherjee, D., (1981), "Ascorbic acid metabolism in diabetes mellitus" *Metabolism*, 30:572-577.

Suzuki, J., (1987), "New brain protective agents and clinical use. In Suzuki J. *Advances in surgery of cerebral stroke proceedings of the international symposium on surgery for cerebral stroke.*", Sendai, Springer-Verlag Press, pp 3-11.

Taha, Z., Kiechle, F. ve Malinski, T., (1992), "Oxidation of nitric oxide by oxygen in biological systems-monitored by porphyrinic sensor", *Biophys Res Commun*, 188:734-739.

Tesfamariam, B., Cohen, R.A., (1992), "Role of superoxide anion and endothelium in vasoconstrictor action of prostaglandin endoperoxide.", *Am J Physiol*, 31:H1915 - H1919.

The Diabetes Control and Complications Trial Research Group, (1993), "The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus.", *N.Engl J Med.*, 329:977-986.

Thomas, G. ve Ramwel, P.W., (1992), "Interaction of non-arginine compounds with the endothelium-derived relaxing factor inhibitor, N- monomethyl-L-arginine", *J pharmacol Exp Ther*, 260,676-679.

Tominaga, T., Sato, S., Ohnishi, J. ve Ohnishi, S.T., (1993), "Potentiation of nitric oxide formation following bilateral carotid occlusion and focal cerebral ischemia in the rat: in vivo detection of nitric oxide radical by electron paramagnetic resonance spin trapping", *Brain Res*, 614:342-6.

Toyoda, T. ve Lee, K.S., (1997), "Differential induction of superoxide dismutase in core and penumbra regions after transient focal ischemia in the neocortex", *Neurosci Lett*, Oct 10 253(1-2):29-32.

Traber, M.G., (1999), "Vitamin E", In: Shils M, Olson JA, Shike M, Ross AC, eds. *Nutrition in Health and Disease*. 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 347-362.

Traber, M.G., (2001), "Does vitamin E decrease heart attack risk? Summary and implications with respect to dietary recommendations.", *J Nutr.*, 31(2):395S-397S.

Wallance, P. ve Moncado, S., (1993), "Role of endogenous nitric oxide in septic shock", *New Horiz*, 1:77-86/1993.

Weber, T., Lu, M. ve Andera, L., (2002), "Vitamin E succinate is a potent novel antineoplastic agent with high selectivity and cooperativity with tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (Apo2 ligand) in vivo." *Clin Cancer Res.*, 8(3):863-869.

White, B.C., Grossman, L.I. ve Krause, G.S., (1993), "Brain injury by global ischemia and reperfusion: A theoretical perspective on membrane damage and repair". *Neurology*, 43:1656-65.

White, K.A. ve Marletta, M.A., (1992), "Nitric Oxide is a cytochrome P-450 type hemoprotein". *Biochemistry*, 31,6627-6631.

Witko, S.V., Friedlander, M., Capeillere, B.C., Nguyen, K.T., Nguyen, A.T., Zingraff, J., Jungers, P. ve Descamps, L.B, (1996), "Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia", *Kidney Int*, 49:1304-13.

Wolf, S.P., (1993), "Diabetes mellitus and free radicals", *Br.Med Bull*, 49 (3): 642-652.

You, H., Yu, W., Munoz-Medellin, D., Brown, P.H., Sanders, B.G. ve Kline, K., (2002), "Role of extracellular signal-regulated kinase pathway in RRR-alpha-tocopheryl succinate-induced differentiation of human MDA-MB-435 breast cancer cells.", *Mol Carcinog.* 33(4):228-236.

Yu, W., Sanders, B.G., Kline, K., (2003), "RRR-alpha-tocopheryl succinate-induced apoptosis of human breast cancer cells involves Bax translocation to mitochondria.", *Cancer Res.*, 63(10): 2483-2491.

Zhang, Z.G., Chopp, M., Zalogo, C., Pollock, J.S. ve Forsterman, U., (1993), "Cerebral endothelia nitric oxide syntase expression after local cerebral ischemia in rats", *Stroke*, 24:2016-2022.

ÖZGEÇMİŞ

Doğum Tarihi	03.10.1979	
Doğum Yeri	İstanbul	
Lise	1993-1997	Kadir Has Lisesi
Lisans	1997-2001	Yıldız Teknik Üniversitesi Kimya Lisans
Yüksek Lisans	2001-2005	Yıldız Teknik Üniversitesi Kimya Lisans Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı
Çalıştığı Kurumlar	2003-2004	Biosel İlaç
	2004- Devam ediyor	Plasti-med Tic.A.Ş.